Acest document are doar scop informativ și nu produce efecte juridice. Instituțiile Uniunii nu își asumă răspunderea pentru conținutul său. Versiunile autentice ale actelor relevante, inclusiv preambulul acestora, sunt cele publicate în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene și disponibile pe site-ul EUR-Lex. Aceste texte oficiale pot fi consultate accesând linkurile integrate în prezentul document.

►B

REGULAMENTUL (CE) NR. 440/2008 AL COMISIEI

din 30 mai 2008

de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)

(Text cu relevanță pentru SEE)

(JO L 142, 31.5.2008, p. 1)

Astfel cum a fost modificat prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
►M1	Regulamentul (CE) nr. 761/2009 al Comisiei din 23 iulie 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Regulamentul (UE) nr. 1152/2010 al Comisiei din 8 decembrie 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Regulamentul (UE) nr. 640/2012 al Comisiei din 6 iulie 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Regulamentul (UE) nr. 260/2014 al Comisiei din 24 ianuarie 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Regulamentul (UE) nr. 900/2014 al Comisiei din 15 iulie 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Regulamentul (UE) 2016/266 al Comisiei din 7 decembrie 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Regulamentul (UE) 2017/735 al Comisiei din 14 februarie 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Regulamentul (UE) 2019/1390 al Comisiei din 31 iulie 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

REGULAMENTUL (CE) NR. 440/2008 AL COMISIEI

din 30 mai 2008

de stabilire a metodelor de testare în temeiul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH)

(Text cu relevanță pentru SEE)

Articolul 1

Metodele de testare care urmează să fie aplicate în sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 sunt prezentate în anexa la prezentul regulament.

Articolul 2

Comisia revizuiește, atunci când este cazul, metodele de testare incluse în prezentul regulament în vederea înlocuirii, reducerii sau perfecționării testelor efectuate pe animale vertebrate.

Articolul 3

Toate trimiterile la anexa V la Directiva 67/548/CEE se interpretează ca trimiteri la prezentul regulament.

Articolul 4

Prezentul regulament intră în vigoare în ziua următoare publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la 1 iunie 2008.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

▼B

ANEXĂ

▼M6

Notă:

Înainte de a utiliza oricare dintre următoarele metode de testare pentru a testa o substanță multi-constituentă (MCS), o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produs de reacție complex sau material biologic (UVCB) sau a unui amestec și în cazul în care aplicabilitatea sa pentru testarea MCS, UVCB sau a amestecurilor nu este indicată în respectiva metodă de testare, ar trebui văzut dacă metoda este adecvată pentru obiectivul de reglementare avut în vedere.

Dacă metoda de testare se utilizează pentru testarea MCS, UVCB sau a unui amestec, ar trebui puse la dispoziție suficiente informații despre compoziția sa, în măsura posibilului, de exemplu prin identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile relevante ale constituenților.

▼B

PARTEA A: METODE PENTRU DETERMINAREA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE

CUPRINS

A.1. PUNCTUL DE TOPIRE/CONGELARE

A.2. PUNCTUL DE FIERBERE

A.3. DENSITATEA RELATIVĂ

A.4. PRESIUNEA DE VAPORI

A.5. TENSIUNEA SUPERFICIALĂ

A.6. SOLUBILITATEA ÎN APĂ

A.8. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE

A.9. PUNCTUL DE INFLAMABILITATE

A.10. INFALMABILITATE (SOLIDE)

A.11. INFLAMABILITATE (GAZE)

A.12. INFLAMABILITATE (CONTACTUL CU APA)

A.13. PROPRIETĂȚI PIROFORICE ALE SOLIDELOR ȘI ALE LICHIDELOR

A.14. PROPRIETĂȚI EXPLOZIVE

A.15. PUNCTUL DE AUTOAPRINDERE (LICHIDE ȘI GAZE)

A.16. TEMPERATURA RELATIVĂ DE AUTOAPRINDERE PENTRU SUBSTANȚELE SOLIDE

A.17. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (SOLIDE)

A.18. DETERMINAREA MASEI MOLECULARE NUMERICE MEDII ȘI A DISTRIBUȚIEI MASELOR MOLECULARE A POLIMERILOR

A.19. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN POLIMERI CU MASĂ MOLECULARĂ MICĂ

A.20. COMPORTAMENTUL DE DIZOLVARE/EXTRACȚIE AL POLIMERILOR ÎN APĂ

A.21. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (LICHIDE)

A.22. DIAMETRU MEDIU GEOMETRIC PONDERAT PE LUNGIME AL FIBRELOR

A.23. COEFICIENT DE PARTIȚIE (1-OCTANOL/APĂ): METODA AGITĂRII LENTE

A.24. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE (N-OCTANOL/APĂ), METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

A.25. CONSTANTE DE DISOCIERE ÎN APĂ (METODA DE TITRARE – METODA SPECTROFOTOMETRICĂ – METODA CONDUCTOMETRICĂ)

▼B

A.1. PUNCTUL DE TOPIRE/CONGELARE

1. METODĂ

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt descrise în referințele bibliografice 2 și 3.

1.1. INTRODUCERE

Metodele și dispozitivele descrise se aplică pentru determinarea punctului de topire a substanțelor, oricare ar fi gradul de puritate a acestora.

Alegerea metodei depinde de natura substanței de testat. În consecință, factorul limitativ depinde direct de calitatea substanței de a fi ușor pulverizabilă, greu pulverizabilă sau nepulverizabilă.

Pentru anumite substanțe este preferabil să se determine punctul de congelare sau de solidificare. Acesta este motivul pentru care normele acestor determinări figurează și în prezenta metodă.

Atunci când, datorită proprietăților specifice ale substanței, niciun parametru nu poate fi măsurat într-un mod satisfăcător, se poate determina punctul de curgere.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Punctul de topire se definește ca temperatura la care are loc tranziția de fază din stare solidă în stare lichidă, la presiunea atmosferică, temperatură care în mod ideal corespunde temperaturii de congelare.

Deoarece în cazul multor substanțe tranziția de fază are loc într-un anumit interval de temperatură, aceasta este deseori descrisă ca interval de topire.

Transformarea unităților de măsură (K în ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t = temperatura Celsius, exprimată în grade Celsius (^{o}C)

T = temperatura termodinamică, exprimată în grade Kelvin (K)

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință de fiecare dată când se studiază o substanță nouă. Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateței metodei și să permită comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Câteva substanțe-mamă sunt enumerate în referințele bibliografice (4).

▼B

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se determină temperatura (intervalul de temperatură) la care are loc tranziția de fază din starea solidă în starea lichidă. În practică, se determină temperaturile fazei inițiale de topire/congelare și finale de topire/congelare în timpul încălzirii/răcirii unei mostre de substanță la presiunea atmosferică Sunt descrise cinci tipuri de metode, și anume: metoda capilară, metoda blocului fierbinte, determinarea punctului de congelare, metoda analizei termice și determinarea punctului de curgere (pentru uleiurile din petrol).

În anumite cazuri, poate fi mai ușor să se măsoare punctul de congelare în locul punctului de topire.

1.4.1. **Metoda tubului capilar**

1.4.1.1. *Dispozitiv cu baie de lichid*

Se introduce o cantitate mică de substanță pulverizată fin într-un tub capilar și se tasează cu atenție. Se încălzește tubul în același timp cu un termometru și pe parcursul operației se reglează creșterea temperaturii cu puțin sub 1 K pe minut. Se înregistrează temperaturile la început și la sfârșit de topire.

1.4.1.2. *Dispozitiv prevăzut cu bloc metalic fierbinte*

Metoda este aceeași cu cea descrisă la punctul 1.4.1.1, cu diferența că tubul capilar și termometrul sunt plasate într-un bloc de metal încălzit și observate prin orificii practicate în acest bloc.

1.4.1.3. *Detecție fotoelectrică*

Eșantionul conținut în tubul capilar se încălzește automat într-un cilindru metalic. Printr-un orificiu practicat în acest cilindru se trimite un fascicul de lumină prin substanța de testat către o celulă fotoelectrică etalonată cu precizie. În momentul topirii, proprietățile optice ale majorității substanțelor se modifică, în sensul că din opace devin transparente. Astfel, intensitatea luminii care atinge celula fotoelectrică crește și trimite un semnal de oprire indicatorului digital care înregistrează temperatura termometrului cu rezistență de platină plasat în incinta de încălzire. Această metodă nu se poate aplica anumitor substanțe puternic colorate.

1.4.2. **Metode cu suprafață încălzită**

1.4.2.1. *Metoda bancului de încălzire Kofler*

Bancul de încălzire Kofler este compus din două piese cu conductivitate termică diferită care se încălzesc electric. Bancul este construit astfel încât gradientul de temperatură să fie aproape linear pe toată lungimea. Temperatura acestui banc de încălzire poate fi determinată de la 283 la 573 K datorită unui dispozitiv de citire a temperaturii format dintr-un cursor cu ac indicator și o riglă gradată concepute special pentru bancul în cauză. Pentru a determina un punct de topire, este suficientă depunerea unui strat fin de substanță direct pe suprafața bancului. În câtva secunde se formează o linie fină de diviziune între faza fluidă și faza solidă. Temperatura la linia de diviziune se citește plasând acul indicator în dreptul acesteia.

▼B

1.4.2.2. *Microscop pentru determinarea punctului de topire*

Pentru determinarea punctelor de topire cu cantități foarte mici de substanță se folosesc câteva tipuri de microscoape optice cu încălzire. Temperatura se măsoară în general cu ajutorul unui termocuplu sensibil, dar și cu ajutorul unui termometru cu mercur. Dispozitivul tip pentru determinarea punctului de topire prin microscopie optică la cald este format dintr-o incintă cu încălzire, care conține o placă de metal deasupra căreia se pune eșantionul, deja așezat pe o lamă transparentă. În centrul plăcii metalice există un orificiu care permite trecerea luminii provenite din oglinda de iluminare a microscopului. În timpul utilizării, incinta se închide cu ajutorul unei plăci de sticlă pentru a împiedica circulația aerului în câmpul de lucru.

Încălzirea eșantionului se reglează cu ajutorul unui reostat. Pentru măsurători foarte precise la substanțele anizotrope optic se poate folosi lumina polarizată.

1.4.2.3. *Metoda meniscului*

Această metodă se aplică în special poliamidelor.

Se determină temperatura la care se observă cu ochiul liber deplasarea unui menisc de ulei de silicon, prins între o suprafață caldă și o lamelă plasată peste eșantionul de poliamidă de testat.

1.4.3. **Metoda de determinare a punctului de congelare**

Se introduce eșantionul într-o eprubetă specială și se așează într-un aparat care permite determinarea punctului de congelare. Se agită ușor eprubeta pe parcursul răcirii, iar temperatura este măsurată la intervale adecvate. Din momentul în care temperatura rămâne constantă la câteva citiri, valoarea acesteia este considerată punct de congelare (după corecția termometrică).

Trebuie evitată răcirea forțată prin menținerea echilibrului între faza solidă și cea lichidă.

1.4.4. **Analiza termică**

1.4.4.1. *Analiza termică diferențială (DTA)*

Această tehnică înregistrează diferența de temperatură dintre eșantion și un material de referință, în funcție de temperatură, atunci când substanța și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim termic controlat. Atunci când eșantionul suferă o transformare ce presupune o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (topire) sau exotermă (congelare) de linia de referință a temperaturii.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetrie diferențială (DSC)*

Această tehnică înregistrează diferența dintre cantitățile de energie absorbite de eșantion și un material de referință în funcție de timp, atunci când eșantionul și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim de temperatură controlată. Această energie reprezintă energia necesară pentru ca diferența de temperatură dintre substanță și materialul de referință să devină nulă. Atunci când eșantionul suferă o transformare care implică o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (topire) sau exotermă (congelare) de la linia de referință a fluxului termic.

1.4.5. **Punctul de curgere**

Această metodă a fost elaborată pentru a fi folosită în cazul uleiurilor din petrol și se utilizează în cazul substanțelor uleioase cu temperaturi de topire scăzute.

După o încălzire preliminară, eșantionul se răcește cu o viteză specifică și se examinează din punctul de vedere al caracteristicilor de curgere la intervale de 3 K. Cea mai scăzută temperatură la care se mai observă o deplasare a substanței se înregistrează ca punct de curgere.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Aplicabilitatea și acuratețea diferitelor metode folosite pentru determinarea punctului de topire/intervalului de topire sunt prezentate în următorul tabel:

TABEL: APLICABILITATEA METODELOR

A. **Metode capilare**

Metodă de măsurare	Substanțe ușor pulverizabile	Substanțe greu pulverizabile	Interval de temperatură	Acuratețea estimării [1]	Standarde existente
Dispozitiv prevăzut cu baie de lichid	Da	Numai câteva	273 la 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispozitiv prevăzut cu bloc metalic	Da	Numai câteva	293 la > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detecție fotoelectrică	Da	Mai multe cu dispozitive de aplicare	253 la 573 K	± 0,5 K	

[1] În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate a substanței.

▼B

B. **Metoda cu suprafață încălzită și metoda punctului de congelare**

Metodă de măsurare	Substanțe ușor pulverizabile	Substanțe greu pulverizabile	Interval de temperatură	Acuratețea estimării (1)	Standarde existente
Banc de încălzire Kofler	Da	N u	283 la > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Microscop pentru determinarea punctului de topire	Da	Numai la câteva	273 la > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metoda meniscului	Nu	Special pentru poliamide	293 la > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metode de determinare a punctului de congelare	Da	Da	223 la 573 K	± 0,5 K	ex. BS 4695

(1) În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

C. **Metode de analiză termică**

Metodă de măsurare	Substanțe ușor pulverizabile	Substanțe greu pulverizabile	Interval de temperatură	Acuratețea estimării (1)	Standarde existente
Analiza termică diferențială	Da	Da	173 la 1 273 K	până la 600 K ± 0,5 K până la 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Calorimetrie diferențială	Da	Da	173 la 1 273 K	până la 600 K ± 0,5 K până la 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

D. **Punct de curgere**

Metodă de măsurare	Substanțe ușor pulverizabile	Substanțe greu pulverizabile	Interval de temperatură	Acuratețea estimării (1)	Standarde existente
Punct de curgere	Pentru uleiuri petroliere și substanțe uleioase	Pentru uleiuri petroliere și substanțe uleioase	223 la 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) În funcție de tipul de instrument și gradul de puritate al substanței.

1.6. DESCRIEREA METODELOR

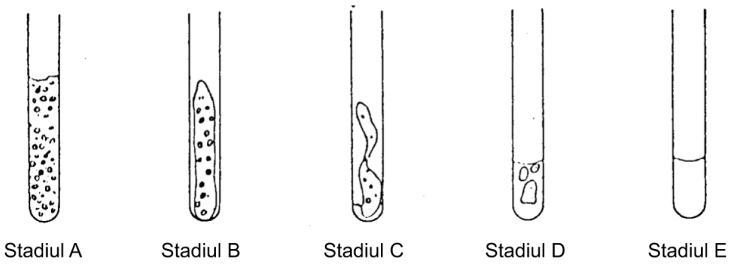
Modurile de operare corespunzătoare aproape tuturor metodelor de testare au fost descrise în standardele internaționale și naționale (a se vedea apendicele).

1.6.1. **Metode cu tub capilar**

Atunci când sunt supuse unei creșteri de temperatură, substanțele fin pulverizate prezintă de regulă stadiile de topire prezentate în figura 1.

▼B

Figura 1



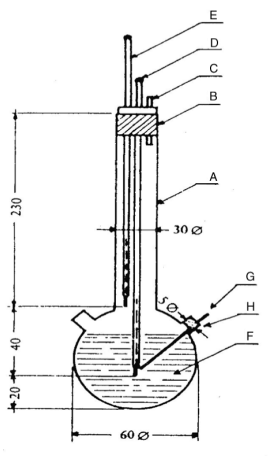
Stadiul A	(începutul topirii): punct umed: se formează picături fine pe peretele interior al tubului capilar.
Stadiul B	apare un spațiu liber între eşantion şi peretele interior al tubului datorită retracției produsului în faza de topire.
Stadiul C	eşantionul retractat începe să se scufunde şi să se lichefieze.
Stadiul D	se formează un menisc complet la suprafață dar o cantitate considerabilă din eşantion rămâne în fază solidă.
Stadiul E	(stadiul final al topirii): nu mai există particule solide.

În timpul determinării punctului de topire se înregistrează temperaturile corespunzătoare primului şi ultimului stadiu al procesului.

1.6.1.1. *Instalație pentru determinarea punctului de topire cu baie de lichid*

Figura 2 descrie un tip de aparat standardizat, confecționat din sticlă (JIS K 0064). Toate specificațiile sunt exprimate în milimetri.

Figura 2



A: Balon de măsură
B: Dop de plută
C: Tub de aerare
D: Termometru
E: Termometru auxiliar
F: Baie de lichid
G: Tub capilar confecționat din sticlă, lungime 80-100 mm, diametru interior 1,0 ± 0,2 mm, grosimea peretelui 0,2-0,3 mm
H: Tub lateral

▼B

Baia de lichid:

Lichidul care se folosește se alege în funcție de punctul de topire care urmează să fie determinat, de exemplu parafină lichidă pentru punctele de topire care nu depășesc 473 K, ulei de silicon pentru punctele de topire care nu depășesc 573 K.

Se poate folosi un amestec din trei părți de acid sulfuric și două părți de sulfat de potasiu (în proporție masică) pentru punctele de topire care depășesc 523 K. În cazul utilizării unui astfel de amestec, se vor lua măsurile de precauție corespunzătoare.

Termometrul:

Pot fi folosite numai acele termometre care îndeplinesc cerințele următoarelor standarde sau ale standardelor echivalente:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Mod de operare:

Substanța uscată se pulverizează fin într-un mojar și se introduce într-un tub capilar, închis la un capăt, astfel încât înălțimea de umplere să fie de aproximativ 3 mm după ce substanța a fost compactată. Pentru a obține un eșantion uniform compactat, tubul capilar trebuie să fie lăsat să cadă de la o înălțime de aproximativ 700 mm, printr-un tub de sticlă vertical pe o sticlă de ceas.

Tubul capilar plin este plasat în baie astfel încât partea centrală a rezervorului de mercur al termometrului să fie în contact cu partea tubului capilar care este amplasat eșantionul. De obicei, tubul capilar se introduce în baie la aproximativ 10 K sub punctul de topire.

Lichidul băii se încălzește astfel încât creșterea temperaturii să fie de 3 K/min. Lichidul trebuie agitat. La aproximativ 10 K sub temperatura presupusă de topire, viteza de creștere a temperaturii se stabilește la maximum 1 K pe minut.

Calcul:

Calculul punctului de topire este redat mai jos:

$$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E) \times n$$

unde:

T = temperatura de topire corectată, exprimată în K

T_D = temperatura citită la termometrul D, exprimată în K

T_E = temperatura citită la termometrul E, exprimată în K

n = numărul de gradații ale coloanei de mercur citite pe tija termometrului D, aflate deasupra lichidului.

1.6.1.2. *Dispozitive cu bloc metalic pentru măsurarea punctului de topire*

Aparatură:

Aparatul cuprinde:

— un bloc metalic cilindric, a cărui parte superioară este scobită și formează o incintă de încălzire (a se vedea figura 3);

— un dop metalic prevăzut cu două sau mai multe orificii care permit introducerea tuburilor în bloc;

▼B

— un sistem de încălzire a blocului metalic care poate fi format dintr-o rezistență electrică în bloc;

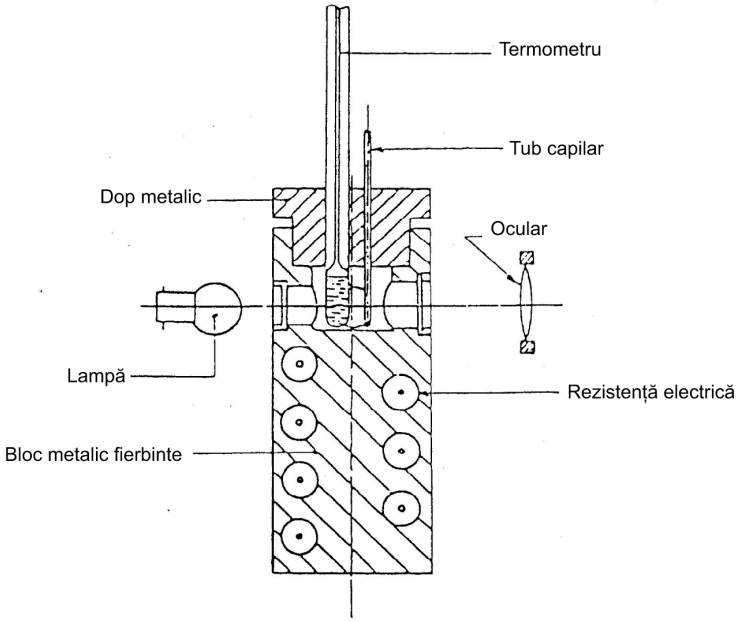
— un reostat pentru reglarea puterii, în cazul unei încălziri electrice;

— patru ferestre din sticlă termorezistentă, pe pereții laterali ai incintei, dispuse simetric în unghi drept. În fața uneia din ferestre se montează un ocular pentru observarea tubului capilar. Celelalte trei ferestre permit iluminarea interiorului incintei cu ajutorul unor lămpi;

— un tub capilar din sticlă termorezistentă închis la un capăt (a se vedea punctul 1.6.1.1).

A se vedea standardele menționate la punctul 1.6.1.1. Se pot folosi, de asemenea, elemente termoelectrice de precizie echivalentă.

Figura 3



1.6.1.3. *Detecție fotoelectrică*

Aparatură și mod de operare:

Aparatul este format dintr-o incintă metalică prevăzută cu un sistem de încălzire automatizat. Se umplu trei tuburi capilare după cum s-a indicat la punctul 1.6.1.1 și se pun în cuptor.

▼B

Pentru calibrarea aparatului se folosesc mai multe creșteri liniare de temperatură, iar creșterea de temperatură convenabilă este reglată electric la o viteză constantă și liniară, preselectată. Înregistratoarele indică temperatura reală a cuptorului și temperatura substanței în tuburile capilare.

1.6.2. **Metodele suprafeței încălzite**

1.6.2.1. *Bancul de încălzire Kofler*

A se vedea apendicele.

1.6.2.2. *Microscopul pentru determinarea punctului de topire*

A se vedea apendicele.

1.6.2.3. *Metoda meniscului (poliamide)*

A se vedea apendicele.

În jurul punctului de topire, creșterea temperaturii trebuie să fie mai mică de 1 K pe minut.

1.6.3. **Metode pentru determinarea punctului de congelare**

A se vedea apendicele.

1.6.4. **Analiza termică**

1.6.4.1. *Analiza termică diferențială*

A se vedea apendicele.

1.6.4.2. *Calorimetria diferențială*

A se vedea apendicele.

1.6.5. **Determinarea punctului de curgere**

A se vedea apendicele.

2. **DATE**

În unele cazuri se impune corecția termometrică.

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— metoda folosită;

— specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există;

— estimare acurateței metodei.

Punctul de topire indicat în raport este media a cel puțin două măsurători care se găsesc în intervalul de precizie estimat (a se vedea tabelele).

▼B

Dacă diferența dintre temperatura din stadiul inițial și cea din stadiul final al topirii se află în limitele de precizie a metodei, temperatura de topire în stadiul final este considerată ca punct de topire; în caz contrar, se indică în raport cele două temperaturi.

Dacă substanța se descompune sau sublimează înainte de a atinge punctul de topire, se indică în raport temperatura la care s-a observat efectul.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impuritățile și starea fizică a substanței.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline. 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, p. 803-834.

3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ, New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 505-515.

▼B

Apendice

Pentru mai multe detalii tehnice, pot fi consultate următoarele standarde.

1. **Metodele tubului capilar**

1.1. Dispozitive pentru măsurarea punctului de topire cu baie de lichid

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfarehn
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Dispozitive pentru determinarea punctului de topire cu bloc metalic fierbinte

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

2. **Metodele suprafeței calde**

2.1. Banc de încălzire Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Microscop pentru determinarea punctului de topire

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Metoda meniscului (poliamide)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion” méthode du menisque

3. **Metode pentru determinarea punctului de congelare**

BS 4633	Method for the determination of crystallising point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congelation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Analiza termică**

4.1. Analiza termică diferențială

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetrie diferențială

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Determinarea punctului de curgere**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B

A.2. PUNCTUL DE FIERBERE

1. METODĂ

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt prezentate în referințele bibliografice 2 și 3.

1.1. INTRODUCERE

Metodele și aparatele descrise în continuare pot fi aplicate substanțelor lichide și celor cu punct de topire scăzut, care nu intră în reacție chimică sub punctul de fierbere (de exemplu, auto-oxidare, izomerizări, degradare etc.). Metodele se aplică substanțelor lichide pure și impure.

Se acordă atenție descrierii metodelor care folosesc detecția fotoelectrică și analiza termică deoarece acestea permit determinarea nu numai a punctului de fierbere, ci și a punctului de topire. În plus, măsurările se pot efectua în mod automat.

„Metoda dinamică” are avantajul că poate fi folosită și pentru determinarea presiunii vaporilor, iar aducerea temperaturii de fierbere la condiții normale de presiune (101,325 kPa) nu este necesară, deoarece se poate menține presiunea normală pe parcursul măsurării, folosind un manometru de contact.

Observații:

Influența impurităților asupra determinării punctului de fierbere depinde în mare măsură de natura impurităților. Atunci când există în eșantion impurități volatile care ar putea afecta rezultatele, substanța se purifică.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Punctul de fierbere normal se definește ca temperatura la care presiunea de vapori a lichidului este 101,325 kPa.

Dacă punctul de fierbere nu se măsoară la presiune atmosferică normală, relația între temperatură și presiunea de vapori este dată de ecuația Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3RT} + const.$$

unde:

P = presiunea de vapori a substanței, exprimată în pascali

ΔH_v = căldura sa de vaporizare, exprimată în J mol^{-1}

R = constanta universală a gazelor = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura termodinamică, exprimată în K

Indicarea punctului de fierbere este însoțită de precizarea presiunii ambiante în timpul măsurătorii.

▼B

Formule de conversie

Presiunea (unități: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(folosirea „barului” este încă permisă, dar nu este recomandată)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(unitățile „mm Hg” și „Torr” nu sunt permise).

1 atm = atmosferă standard = 101 325 Pa

(unitatea „atm” nu este permisă).

Temperatura (unități: K)

$t = T - 273,15$

t: temperatura Celsius, exprimată în grade Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinamică, exprimată în grade Kelvin (K)

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Anumite substanțe de etalonare sunt menționate în metodele enumerate în apendice.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Cinci metode pentru determinarea punctului de fierbere (a intervalului de fierbere) se bazează pe măsurătoarea temperaturii de fierbere, alte două se bazează pe analiza termică.

1.4.1. **Determinarea prin folosirea ebuliometrului**

Ebuliometrele au fost create inițial pentru determinarea masei moleculare prin creșterea punctului de fierbere, dar sunt adecvate și pentru măsurarea exactă a punctului de fierbere. Un aparat foarte simplu este descris în standardul ASTM D 1120-72 (a se vedea apendicele). Lichidul se încălzește în acest aparat în condiții de echilibru la presiune atmosferică, până la fierbere.

1.4.2. **Metoda dinamică**

Această metodă prevede măsurarea temperaturii de recondensare a vaporilor cu ajutorul unui termocuplu montat în reflux în timpul fierberii. În această metodă se poate modifica presiunea.

1.4.3. **Metoda distilării pentru punctul de fierbere**

Această metodă prevede distilarea lichidului, măsurarea temperaturii de recondensare a vaporilor și determinarea cantității de distilat.

▼B

1.4.4. **Metoda Siwoloboff**

Se încălzește un eșantion într-o eprubetă care este imersată într-o baie cu lichid încălzit. Se scufundă în eprubetă un capilar închis, care conține o bulă de aer în partea inferioară.

1.4.5. **Detecția fotoelectrică**

Conform principiului Siwoloboff, măsurarea fotoelectrică automată se face folosind ascensiunea bulelor.

1.4.6. **Analiza termică diferențială**

Această tehnică înregistrează diferența de temperatură dintre substanță și un material de referință în funcție de temperatură în timp ce substanța și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim termic controlat. Atunci când eșantionul trece printr-o stare de tranziție ce presupune o variație de entalpie, această modificare este indicată prin endotermică (fierbere) de la linia de referință a temperaturii.

1.4.7. **Calorimetria diferențială**

Această tehnică înregistrează diferența dintre cantitățile de energie absorbite de o substanță și un material de referință în funcție de timp, atunci când eșantionul și materialul de referință sunt supuse aceluiași regim de temperatură controlată. Această energie reprezintă energia necesară pentru ca diferența de temperatură dintre substanță și materialul de referință să devină nulă. Atunci când eșantionul suferă o transformare care implică o modificare de entalpie, acea modificare este indicată prin îndepărtarea endotermă (fierbere) de la linia de referință a fluxului termic.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Aplicabilitatea și precizia diferitelor metode folosite la determinarea temperaturii/intervalului de fierbere sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Compararea metodelor

Metodă de măsurare	Precizie estimată	Standard existent
Ebuliometru	± 1,4 K (până la 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (până la 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Metoda dinamică	± 0,5 K (până la 600 K) (2)	
Metoda distilării (domeniu de fierbere)	± 0,5 K (până la 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Conform cu Siwoloboff	± 2 K (până la 600 K) (2)	
Detecție fotoelectrică	± 0,3 K (până la 373 K) (2)	
Calorimetrie termică diferențială	± 0,5 K (până la 600 K) ± 2,0 K (până la 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetrie diferențială	± 0,5 K (până la 600 K) ± 2,0 K (până la 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Această precizie este valabilă numai pentru dispozitive simple cum ar fi cel descris în ASTM D 1120-72; aceasta poate fi îmbunătățită cu ebuliometre mult mai sofisticate.

(2) Valabil numai pentru substanțe pure. Folosirea în alte circumstanțe trebuie să fie justificată.

▼B

1.6. DESCRIEREA METODELOR

Modurile de operare în unele metode de testare sunt descrise în standardele naționale și internaționale (a se vedea apendicele).

1.6.1. **Ebuliometru**

A se vedea apendicele.

1.6.2. **Metoda dinamică**

A se vedea metoda de analiză A.4 pentru determinarea presiunii de vapori.

Se înregistrează temperatura de fierbere observată la o presiune aplicată de 101,325 kPa.

1.6.3. **Metoda distilării (intervalul de fierbere)**

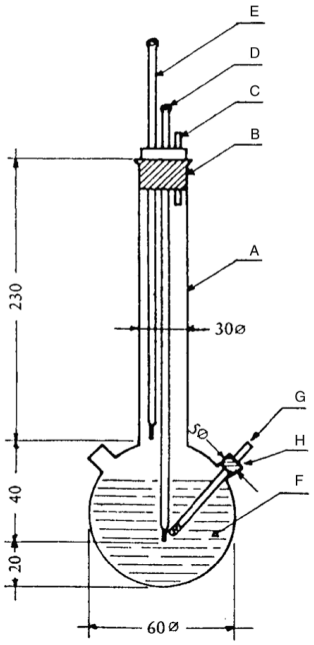
A se vedea apendicele.

1.6.4. **Metoda Siwoloboff**

Se introduce eșantionul într-o eprubetă cu un diametru de cca. 5 milimetri și se încălzește într-un aparat care servește la determinarea punctului de topire (figura 1).

Figura 1 prezintă schema unui aparat standardizat de măsurare a punctului de topire și fierbere (JIS K 0064) (confecționat din sticlă, toate specificațiile sunt în milimetri).

Figura 1



A: Balon de măsură
B: Dop de plută
C: Tub de aerare
D: Termometru
E: Termometru auxiliar
F: Baie de lichid
G: Tub capilar confecționat din sticlă, lungime aprox. 100 mm, diametru interior 1 mm, grosimea peretelui 0,2-0,3 mm
H: Tub lateral

Se scufundă un tub capilar (capilar de fierbere), închis la cca. 1 centimetru deasupra extremității inferioare, în eprubeta cu substanța de testat. Nivelul până la care se adaugă substanță de testat este astfel încât partea etanșată a capilarului să fie sub nivelul suprafeței lichidului. Eprubeta se atașează la termometru cu o bandă de cauciuc sau se fixează cu un suport de partea laterală (a se vedea figura 2).

▼B

Figura 2

Metoda Siwoloboff

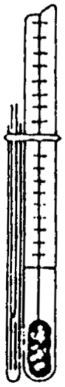
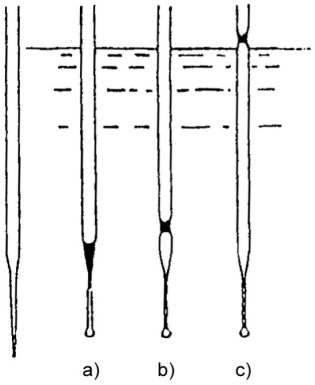


Figura 3

Metoda modificată



Lichidul din baie se alege în funcție de punctul de fierbere. La temperaturi de până la 573 K se folosește uleiul de silicon. Parafina lichidă se poate folosi numai până la 473 K. Încălzirea băii de lichid se reglează pentru început la o creștere de temperatură de 3 K/min. Lichidul din baie trebuie agitat. La aproximativ 10 K sub punctul de fierbere presupus, încălzirea se reduce astfel încât viteza de creștere a temperaturii să fie mai mică de 1 K/min. Atunci când se apropie de punctul de fierbere, bulele încep să se ridice rapid din capilar.

Punctul de fierbere este acea temperatură la care, în cazul unei răciri momentane, șiragul de bule se întrerupe, iar fluidul începe brusc să se ridice în capilar. Temperatura citită în acel moment pe termometru indică punctul de fierbere a substanței.

În metoda modificată (a se vedea figura 3), punctul de fierbere se determină într-un tub capilar de măsurat la punctul de topire. Extremitatea inferioară a acestuia se prelungește cu un vârf cu o lungime de aproximativ 2 cm (a) în interiorul căruia se aspiră o cantitate mică de substanță de testat. Se etanșează vârful prin încălzire, captându-se o bulă mică de aer în interior. În timpul încălzirii, în aparatul de măsurat punctul de topire (b), bula de aer se dilată. Punctul de fierbere corespunde temperaturii la care eșantionul de substanță atinge nivelul suprafeței lichidului din baie (c).

1.6.5. **Detecția fotoelectrică**

Se încălzește un eșantion din substanța de testat într-un tub capilar așezat în interiorul unui bloc metalic de încălzire.

Prin orificiile practicate în bloc, un fascicol de lumină este trimis prin substanță către o celulă fotoelectrică calibrată cu precizie.

În timp ce crește temperatura eșantionului, bule de aer individuale încep să se ridice din tubul capilar. Când punctul de fierbere este atins, numărul de bule crește substanțial. Modificarea intensității luminoase care urmează este înregistrată de către celulă, care trimite un semnal de oprire indicatorului de temperatură, respectiv un termometru cu rezistență de platină plasat în interiorul blocului.

Această metodă este deosebit de utilă deoarece permite efectuarea unor determinări sub nivelul temperaturii ambiante până la 253,15 K (– 20 °C), fără nicio modificare a aparatului. Este necesar doar ca aparatul să fie așezat într-o baie de răcire.

▼B

1.6.6. **Analize termice**

1.6.6.1. *Analiza termică diferențială*

A se vedea apendicele.

1.6.6.2. *Calorimetria diferențială*

A se vedea apendicele.

2. **DATE**

Pentru diferențe mici față de presiunea normală (maximum ± 5 kPa) punctul de fierbere se poate corecta (T_n) cu ajutorul ecuației Sidney-Young:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

unde:

Δp = (101,325 – p) (atenție la semn)

p = presiunea măsurată, în kPa

f_T = viteza de variație a punctului de fierbere cu presiunea, în K/kPa

T = temperatura de fierbere măsurată, în K

T_n = temperatura de fierbere corectată la presiunea normală, în K

Pentru numeroase substanțe, factorii de corecție a temperaturii f_T și ecuațiile pentru aproximarea acestora figurează în standardele naționale și internaționale mai sus menționate.

De exemplu, metoda DIN 53171 menționează următoarele corecții aproximative pentru solvenți conținuți în vopsele.

Tabelul 2

Temperatura – factori de corecție f_T

Temperatura T (K)	Factori de corecție f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— metoda folosită;

— specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există;

— estimarea acurateței metodei.

Punctul de fierbere indicat în raport este media a cel puțin două măsurători care se găsesc în intervalul de precizie estimat (a se vedea tabelul 1).

Se prezintă punctele de fierbere măsurate și media lor, iar presiunea (presiunile) la care s-au făcut măsurătorile se exprimă în kPa. Este preferabil ca presiunea să fie apropiată de presiunea atmosferică normală.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impurități și la starea fizică a substanței.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

3. R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Apendice

Pentru mai multe date tehnice, pot fi consultate standardele următoare, de exemplu.

1. **Ebuliometru**

1.1. Dispozitive cu baie de lichid

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Metoda distilării (a intervalului de fierbere)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analiza termică diferențială și calorimetria diferențială**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3. DENSITATEA RELATIVĂ

1. METODĂ

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt menționate în referința bibliografică 2.

1.1. INTRODUCERE

Metodele descrise pentru determinarea densității relative sunt aplicabile substanțelor solide și lichide, fără nicio restricție cu privire la gradul de puritate. Diferitele metode care pot fi folosite sunt prezentate în tabelul 1.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Densitatea relativă D^{20}_4 a solidelor sau lichidelor reprezintă raportul dintre masa unui volum de substanță, determinată la 20 °C, și masa aceluiași volum de apă, determinată la 4 °C. Densitatea relativă este un număr adimensional.

Densitatea ρ a unei substanțe este raportul dintre masa acesteia m și volumul său v.

Densitatea ρ este exprimată în unități SI în kg/m^3.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ (1) (3)

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință de fiecare dată când se studiază o substanță nouă. Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateței metodei și să permită comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

1.4. PRINCIPIUL METODELOR

Se folosesc 4 clase de metode.

1.4.1. **Metode prin flotabilitate**

1.4.1.1. *Hidrometrul* (pentru substanțe lichide)

Se pot obține determinări ale densității suficient de precise și de rapide cu ajutorul unor hidrometre plutitoare care permit deducerea densității unui lichid din adâncimea de imersiune indicată pe o scară gradată.

1.4.1.2. *Balanța hidrostatică* (pentru substanțe lichide și solide)

Diferența dintre masa unui eșantion măsurate în aer și într-un lichid corespunzător (de exemplu apa) poate fi folosită pentru a determina densitatea acestuia.

În cazul solidelor, densitatea măsurată nu este reprezentativă decât în cazul acelui eșantion. Pentru a determina densitatea unui lichid se cântărește un corp cu volum V cunoscut, întâi în aer, apoi în lichid.

1.4.1.3. *Metoda corpului scufundat* (pentru substanțe lichide) (4)

În această metodă, densitatea unui lichid este determinată ca diferența dintre rezultatele cântăririlor lichidului înainte și după imersia unui corp de volum cunoscut în acest lichid.

▼B

1.4.2. **Metode picnometrice**

În cazul solidelor sau al lichidelor se pot folosi picnometre cu forme diferite, ale căror volume sunt cunoscute. Densitatea se determină pornind de la diferența de greutate între picnometrul plin și picnometrul gol, pe de o parte, și volumul cunoscut al acestuia, pe de altă parte.

1.4.3. **Picnometru de comparație cu aer** (pentru solide)

Densitatea unui solid cu orice formă poate fi măsurată, la temperatura camerei cu ajutorul unui picnometru de comparație cu gaz. Volumul unei substanțe în aer sau în gaz inert se măsoară într-un cilindru gradat, cu volum variabil calibrat. Pentru determinarea densității, după măsurarea volumului se măsoară și masa solidului.

1.4.4. **Densimetru oscilant** (5) (6) (7)

Densitatea unui lichid se poate măsura cu densimetrul oscilant. Un oscilator mecanic în formă de U vibrează cu o frecvență de rezonanță care depinde de masa sa. Introducerea unui eșantion de substanță modifică frecvența de rezonanță a oscilatorului. Acesta trebuie etalonat cu ajutorul a două substanțe ale căror densități se cunosc. Substanțele se aleg astfel încât densitățile acestora să acopere intervalul de măsură.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Aplicabilitatea diferitelor metode folosite pentru determinarea densității relative este prezentată în tabel.

1.6. DESCRIEREA METODELOR

Standardele menționate ca exemple, care se pot consulta pentru mai multe detalii tehnice, sunt enumerate în apendice.

Testele se efectuează la o temperatură de 20 ^{o}C și trebuie să cuprindă cel puțin două măsurători.

2. **DATE**

A se vedea standardele.

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— metoda folosită;

— specificațiile precise ale substanței (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, dacă există.

Densitatea relativă D_4^{20} se indică în conformitate cu definiția de la punctul 1.2, împreună cu starea fizică a substanței.

Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele cu privire la impuritățile și starea fizică a substanței.

▼B

Tabel

Aplicabilitatea metodelor

Metoda de măsurare	Densitate		Vâscozitatea dinamică maximă posibilă	Standarde existente
	Solid	Lichid		
1.4.1.1. Hidrometru		Da	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Balanța hidrostatică				
(a) solide	Da			ISO 1183(A)
(b) lichide		Da	5 Pa s	ISO 901 și 758
1.4.1.3. Metoda plutitorului		Da	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnometru				ISO 3507
(a) solide	Da			ISO 1183(B) NFT 20-053
(b) lichide		Da	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Picnometru de comparație cu aer	Da			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Densimetru oscilant		Da	5 Pa s	

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

3. IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 508.

4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. II, p. 427-430.

5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, p. 297-302.

6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, p. 717-726.

7. Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253-255.

▼B

Apendice

Pentru mai multe detalii tehnice pot fi consultate următoarele standarde suplimentare.

1. **Metode prin flotabilitate**

1.1. Hidrometrul

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardised sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Balanța hidrostatică

Pentru substanțe solide:

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pentru substanțe lichide:

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 şi ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metoda corpului scufundat

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Metode picnometrice**

2.1. Pentru substanțe lichide

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100.10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100.10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

▼B

2.2. Pentru substanțe solide

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Picnometru de comparație cu aer**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. PRESIUNEA DE VAPORI

1. METODĂ

Prezenta metodă este echivalentă cu orientările OECD privind testele nr. 104 (2004).

1.1. INTRODUCERE

Versiunea revizuită a metodei A.4(1) include o metodă suplimentară, metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă, proiectată pentru substanțe cu presiuni de evaporare foarte scăzute (până la 10^{-10} Pa). Având în vedere necesitatea stabilirii de proceduri, în special în cazul obținerii presiunii de vapori pentru substanțele cu presiune de vapori scăzută, sunt reevaluate alte proceduri ale acestei metode în ceea ce privește intervalele diferite de aplicabilitate.

La echilibru termodinamic, presiunea de vapori a unei substanțe în stare pură este exclusiv o funcție de temperatură. Principiile fundamentale sunt descrise în literatura de specialitate (2)(3).

Nu există o singură metodă de măsurare aplicabilă întregului interval de presiuni de vapori de la $< 10^{-10}$ la 10^5 Pa. În această metodă sunt incluse opt metode de măsurare a presiunii de vapori, care pot fi aplicate în intervale diferite de presiuni de vapori. Diferitele metode sunt comparate din punctul de vedere al aplicației și intervalului de măsurare în tabelul 1. Metodele pot fi aplicate doar în cazul compușilor care nu se descompun în condițiile testului. În cazurile în care metodele experimentale nu pot fi aplicate din motive de ordin tehnic, presiunea de vapori poate fi estimată, o metodă de estimare recomandată fiind indicată în apendice.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Presiunea de vapori a unei substanțe este definită ca presiunea de saturație la suprafața de contact cu aerul a unei substanțe solide sau lichide.

Unitatea din Sistemul Internațional (SI) pentru presiune care trebuie folosită este pascalul (Pa). Alte unități alternative folosite de-a lungul timpului, împreună cu factorii lor de conversie, sunt:

1 Torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosferă	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

Unitatea de măsură din SI pentru temperatură este kelvinul (K). Transformarea gradelor Celsius în kelvini are loc după formula:

$$T = t + 273{,}15$$

unde T reprezintă temperatura exprimată în kelvin sau temperatura termodinamică, iar t reprezintă temperatura exprimată în grade Celsius.

▼**M1**

Tabelul 1

Metodă de măsurare	Substanța		Repetabilitate estimată	Reproductibilitate estimată	Interval recomandat
	solid	lichid			
Metoda dinamică	Topire joasă	Da	Până la 25 % 1-5 %	Până la 25 % 1-5 %	10^3 Pa- 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa- 10^5 Pa
Metoda statică	Da	Da	5-10 %	5-10 %	10 Pa- 10^5 Pa 10^{-2} Pa- 10^5 Pa (1)
Metoda izoteniscopului	Da	Da	5-10 %	5-10 %	10^2 Pa- 10^5 Pa
Metoda prin efuziune: balanța pentru presiunea de vapori	Da	Da	5-20 %	Până la 50 %	10^{-3}-1 Pa
Metoda prin efuziune: celulă Knudsen	Da	Da	10-30 %	—	10^{-10}-1 Pa
Metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă	Da	Da	5-30 %	Până la 50 %	10^{-10}-1 Pa
Metoda gazului saturat	Da	Da	10-30 %	Până la 50 %	10^{-10}-10^3 Pa
Metoda rotorului	Da	Da	10-20 %	—	10^{-4}- 0,5 Pa

(1) Când se utilizează un manometru cu capacitanță.

1.3. PRINCIPIUL DE TESTARE

În general, presiunea de vapori este determinată la diferite temperaturi. Într-un interval limitat de temperaturi, logaritmul presiunii de vapori a unei substanțe pure este o funcție lineară a inversului temperaturii termodinamice, conform ecuației Clapeyron-Clausius simplificate:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constant$$

unde:

p = presiunea de vapori a substanței, exprimată în pascali

ΔHv = căldura de vaporizare, exprimată în J mol^{-1}

R = constanta universală a gazelor, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura în K

▼M1

1.4. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință. Acestea servesc în special la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

1.5. DESCRIEREA METODEI

1.5.1. **Metoda dinamică (Metoda lui Cottrell)**

1.5.1.1. *Principiu*

Presiunea de vapori este determinată prin măsurarea temperaturii de fierbere a substanței la diferite presiuni între aproximativ 10^3 și 10^5 Pa. Această metodă este recomandată, de asemenea, pentru determinarea temperaturii de fierbere. Este utilă în acest sens pentru temperaturi până la 600 K. Temperaturile de fierbere ale lichidelor sunt cu aproximativ 0,1 °C mai mari la o adâncime de 3-4 cm decât la suprafață, datorită presiunii hidrostatice a coloanei de lichid. În metoda lui Cottrell (4), termometrul este plasat în vaporii de la suprafața lichidului, iar lichidul în stare de fierbere este pompat constant pe rezervorul termometrului. Rezervorul este acoperit de un strat subțire de lichid aflat în echilibru cu vaporii la presiune atmosferică. Astfel, termometrul indică punctul de fierbere real, fără erori apărute ca urmare a supraîncălzirii sau a presiunii hidrostatice. Pompa utilizată inițial de Cottrell este ilustrată în figura 1. Tubul A conține lichidul de fierbere. Un fir de platină B fixat la baza tubului facilitează fierberea uniformă. Tubul lateral C face legătura cu un condensator, iar mantaua D previne atingerea termometrului E de către condensatul rece. Când lichidul A este la punctul de fierbere, bulele și lichidul prinse în pâlnie se scurg pe rezervorul termometrului prin cele două brațe ale pompei F.

Figura 1

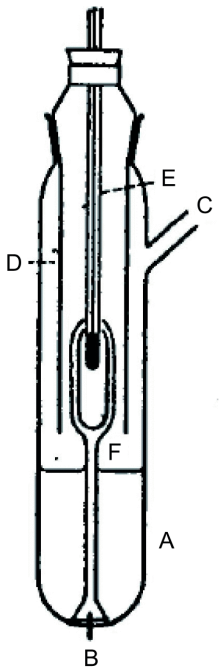
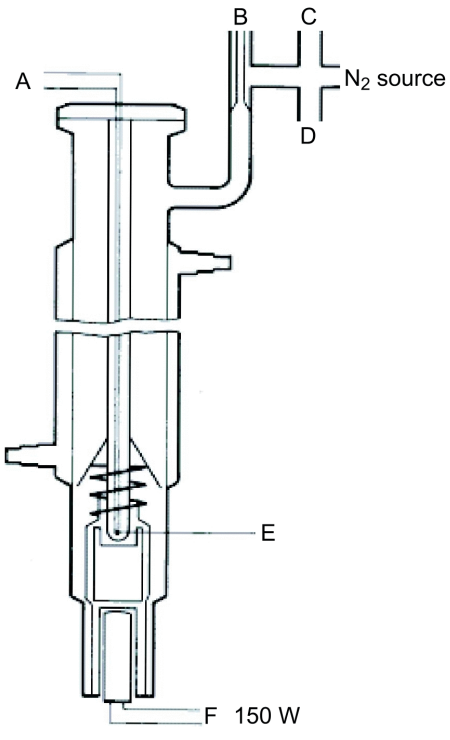


Figura 2



▼**M1**

Pompă Cottrell (4)

A: Termocuplu

B: Volum tampon

C: Manometru

D: Vid

E: Punct de măsurare

F: Element de încălzire (circa 150 W)

1.5.1.2. *Aparatură*

Un aparat foarte precis, care funcționează conform principiului lui Cottrell, este ilustrat în figura 2. Este format dintr-un tub cu o zonă de fierbere în partea inferioară, un vas de răcire în zona mediană și o ieșire și o flanșă în partea superioară. Pompa Cottrell este plasată în zona de fierbere, încălzită cu ajutorul unui cartuș caloric. Temperatura se măsoară cu ajutorul unui termocuplu izolat sau a unui termometru cu rezistență introduse prin flanșa din vârf. Ieșirea se conectează la sistemul de reglare a presiunii. Acesta din urmă este format dintr-o pompă de vid, un volum tampon, un manostat pentru introducerea de azot necesar reglării presiunii și un manometru.

1.5.1.3. *Procedură*

Substanța se pune în zona de fierbere. Pot să apară probleme în cazul solidelor care nu sunt sub formă de pulbere, dar în unele cazuri acestea se pot rezolva încălzind agentul de răcire din mantaua de răcire. Aparatul se închide la flanșă și substanța se degazează. Această metodă nu poate fi folosită în cazul substanțelor care spumează.

Se stabilește cea mai joasă dintre presiunile dorite și se începe încălzirea. În același timp, senzorul de temperatură se conectează la contor.

Echilibrul este atins atunci când se înregistrează o temperatură de fierbere constantă la presiune constantă. Trebuie evitat fenomenul de vaporizare locală cu fierbere violentă. În plus, în vasul de răcire condensarea trebuie să fie completă. Când se determină presiunea de vapori a solidelor cu punct de topire scăzut, trebuie evitată blocarea condensatorului.

După înregistrarea acestui punct de echilibru se stabilește o presiune mai ridicată. Procesul se continuă în același fel până când se atinge o presiune de 10^5 Pa (aproximativ 5-10 măsurători în total). Pentru verificare, aceleași puncte de echilibru trebuie să se regăsească la descreșterea presiunii.

1.5.2. **Metoda statică**

1.5.2.1. *Principiu*

În metoda statică (5), presiunea vaporilor la echilibru termodinamic se determină la o temperatură specificată. Metoda este adecvată substanțelor și solidelor și lichidelor care conțin mai multe componente în intervalul 10^{-1}-10^5 Pa, și în intervalul 1-10 Pa, cu condiția să fie aplicată atent.

▼**M1**

1.5.2.2. *Aparatură*

Echipamentul este format dintr-o baie termostatată (precizie de ± 0,2 K), un recipient pentru eșantion conectat la o linie de vid, un manometru și un sistem de reglare a presiunii. Vasul eșantion (figura 3a) este conectat la linia de vid prin intermediul unui ventil și al unui manometru diferențial (un tub în formă de U cu un fluid manometric adecvat) utilizat ca indicator de zero. În manometrul diferențial se pot folosi mercur, uleiuri de silicon și ftalați, în funcție de intervalul de presiune și comportamentul chimic al substanței de testat. Totuși, din rațiuni de protecție a mediului, utilizarea mercurului trebuie să fie evitată dacă este posibil. Substanța de testat nu trebuie să se dizolve perceptibil sau să reacționeze cu fluidul din tubul în formă de U. În locul tubului în formă de U se poate folosi un manometru (figura 3b). Pentru manometru, mercurul poate fi utilizat în intervalul de presiune de la normală scăzând până la 10^2 Pa, în timp ce uleiurile de silicon și ftalații se folosesc în intervalul de la mai puțin de 10^2 Pa până la 10 Pa. Există și alte tipuri de aparate de măsurare a presiunii utilizabile sub 10^2 Pa, precum și manometre cu membrană rezistente la temperatură care pot fi folosite chiar sub 10^{-1} Pa. Măsurarea temperaturii se face pe peretele exterior al vasului care conține eșantionul sau chiar în vas.

1.5.2.3. *Procedură*

Utilizând aparatul conform descrierii din figura 3a, se umple vasul în formă de U cu lichidul ales, care trebuie să fie degazat la o temperatură ridicată înainte de a se face citirile. Substanța de testat se introduce în aparat și se degazează la temperatură redusă. În cazul unui eșantion cu mai mulți componenți, temperatura trebuie să fie suficient de scăzută pentru a preveni alterarea compoziției materialului. Echilibrul poate fi stabilit mult mai rapid prin agitare. Eșantionul poate fi răcit cu azot lichid sau gheață carbonică, dar sunt necesare precauții pentru evitarea condensării aerului sau lichidului din pompă. Cu ventilul de deasupra vasului deschis, se evacuează aerul prin aspirație, timp de câteva minute. Dacă este necesar, operația de degazare se repetă de câteva ori.

Figura 3a

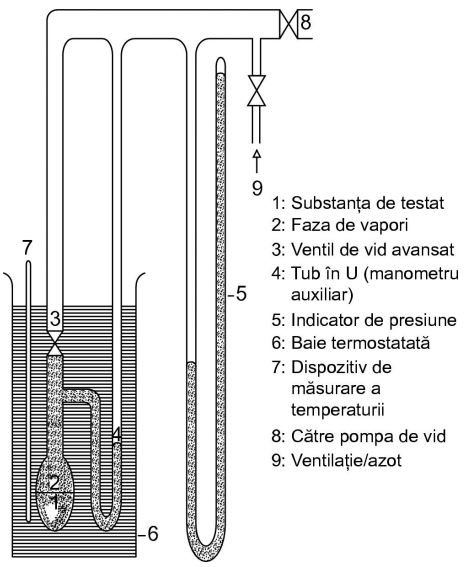
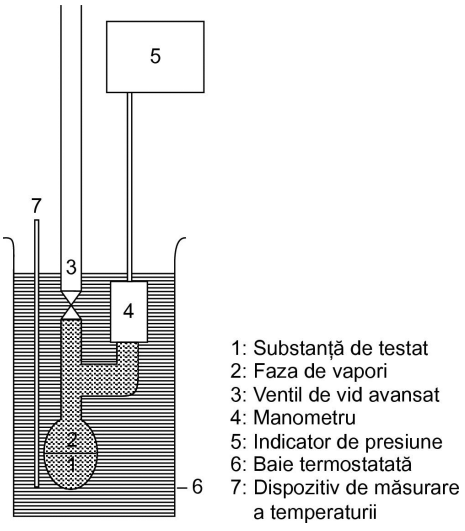


Figura 3b



▼**M1**

Când eșantionul se încălzește cu ventilul închis, presiunea de vapori crește și modifică echilibrul fluidului din manometrul auxiliar. Pentru compensare se introduce azot sau aer în aparat până când indicatorul de presiune diferențială revine la zero. Presiunea cerută pentru echilibrare trebuie să fie citită la un manometru sau la un instrument de mai mare precizie. Această presiune corespunde presiunii de vapori a substanței la temperatura dată a eșantionului. Dacă se folosește aparatul descris în figura 3b, presiunea de vapori este citită direct.

Valorile presiunii de vapori se determină la intervale de timp mici (aproximativ 5-10 măsurători în total) până la temperatura maximă cerută.

Citirile la temperaturi scăzute trebuie să fie repetate pentru verificare. Dacă valorile obținute la citirile repetate nu coincid cu curba obținută pentru creșterea temperaturii, aceasta se poate datora următoarelor cauze:

(i) proba conține încă aer (de exemplu, în cazul materialelor cu vâscozitate mare) sau impurități cu temperaturi de fierbere scăzute, care se evaporă în timpul încălzirii;

(ii) substanța suferă o reacție chimică în intervalul de temperatură analizat (de exemplu descompunere, polimerizare).

1.5.3. **Metoda izoteniscopului**

1.5.3.1. *Principiu*

Metoda izoteniscopului (6) se bazează pe principiul metodei statice. Metoda presupune introducerea unui eșantion într-un rezervor menținut la temperatură constantă și conectat la un manometru și o pompă de vid. Impuritățile mai volatile decât substanța sunt îndepărtate prin degazare la presiune scăzută. Presiunea de vapori a eșantionului la temperaturi prestabilite este echilibrată cu ajutorul unei presiuni cunoscute a unui gaz inert. Izoteniscopul a fost creat pentru a măsura presiunea de vapori a anumitor hidrocarburi lichide, dar poate fi folosit și pentru studierea materialelor solide. De obicei, această metodă nu este adecvată sistemelor multicomponent. Pentru eșantioane care conțin impurități nevolatile, rezultatele sunt supuse unor marje de eroare destul de scăzute. Intervalul recomandat este 10^2-10^5 Pa.

1.5.3.2. *Aparatură*

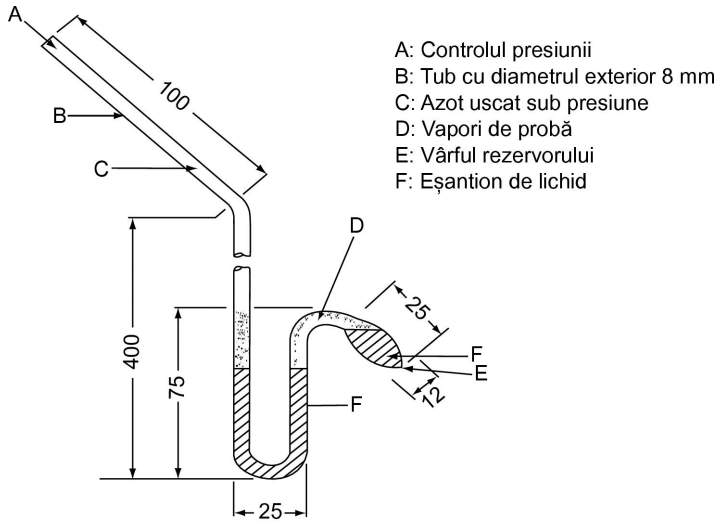
Un exemplu de dispozitiv de măsurare este ilustrat în figura 4. O descriere completă poate fi consultată în ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedură*

În cazul lichidelor, substanța însăși servește ca fluid în manometrul auxiliar. O cantitate de lichid, suficientă pentru a umple rezervorul și brațul scurt al manometrului, se introduce în izoteniscop. Izoteniscopul este atașat la sistemul de vid și golit, după care se umple cu azot. Evacuarea și purjarea sistemului se repetă de două ori pentru îndepărtarea oxigenului rezidual. Izoteniscopul plin este plasat în poziție orizontală, astfel încât proba să se împrăștie într-un strat subțire în rezervorul bulbiform și în manometru. Presiunea sistemului se reduce la 133 Pa și proba se încălzește ușor numai până la fierbere (îndepărtarea gazelor dizolvate). Apoi izoteniscopul este plasat astfel încât proba să se întoarcă în rezervor și în manometru, astfel încât ambele să fie pline cu lichid. Presiunea se menține la 133 Pa. Vârful rezervorului bulbiform se încălzește la flacără mică până când vaporii degajați împing o parte din lichidul de la partea superioară și din brațul manometrului în secțiunea manometrică a izoteniscopului, creând un spațiu umplut cu vapori și fără azot. Izoteniscopul este introdus într-o baie termostatată, iar presiunea azotului este corectată până la presiunea eșantionului. La echilibru, presiunea de vapori a azotului este egală cu presiunea de vapori a substanței.

Figura 4



(Dimensiuni în mm)

În cazul substanțelor solide, în funcție de intervalul de presiune și temperatură, se utilizează lichide manometrice, precum uleiuri de silicon sau ftalați. Lichidul manometric degazat este turnat în curbura brațului lung al izoteniscopului. Apoi, substanțele solide ce urmează să fie analizate sunt puse în rezervorul bulbiform și sunt degazate la temperatură ridicată. În continuare, izoteniscopul este înclinat astfel încât lichidul manometric să curgă în tubul în formă de U.

▼M1

1.5.4. **Metoda prin efuziune: balanța pentru presiunea de vapori (7)**

1.5.4.1. *Principiu*

Un eșantion din substanța de testat se încălzește într-un cuptor mic și se introduce într-un clopot de sticlă vidat. Cuptorul este acoperit cu un capac având găuri de mici dimensiuni de diametru cunoscut. Vaporii substanței evacuați prin una dintre găuri sunt direcționați către un taler al unei balanțe foarte sensibile aflate, de asemenea, în clopotul de sticlă vidat. În unele soluții, talerul balanței este înconjurat de o cutie de răcire, care asigură disiparea căldurii către exterior prin conducție termică, și este răcită prin iradiere, astfel încât vaporii evacuați se condensează pe acesta. Forța jetului de vapori acționează asupra balanței. Presiunea de vapori poate fi calculată în două moduri: direct din forța exercitată asupra talerului balanței, precum și din rata de evaporare, utilizând ecuația Hertz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\,\pi RT \times 10^3}{M}}$$

unde:

G = viteza de evaporare (kg s^{-1} m^{-2})

M = masa moleculară (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = constanta universală a gazelor (J mol^{-1} K^{-1})

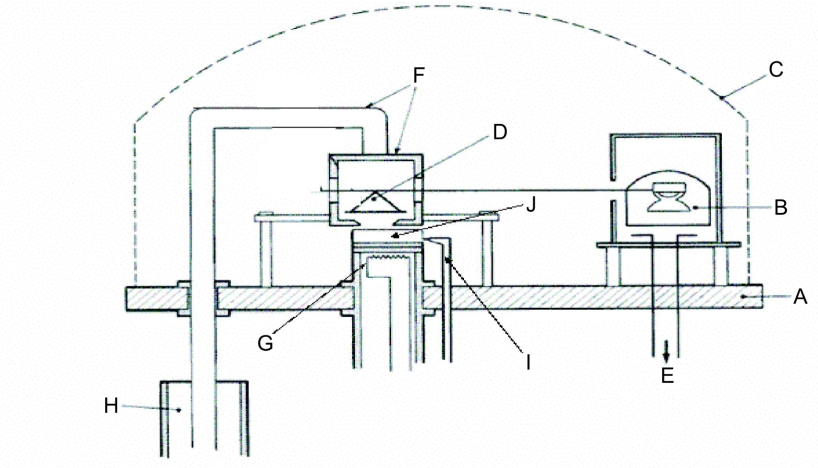
P = presiunea de vapori (Pa)

Intervalul recomandat este 10^{-3}-1 Pa.

1.5.4.2. *Aparatură*

Principiul general al aparatului este ilustrat în figura 5.

Figura 5



A: Placă de bază

B: Instrument cu serpentină mobilă

C: Clopot de sticlă

D: Balanță cu talere

E: Dispozitiv de măsurare a vidului

F: Cutie de refrigerare și bară de răcire

G: Cuptor evaporator

H: Vas Dewar cu azot lichid

I: Punct de măsurare a temperaturii eșantionului

J: Substanță de testare

▼**M1**

1.5.5. **Metoda prin efuziune: celula Knudsen**

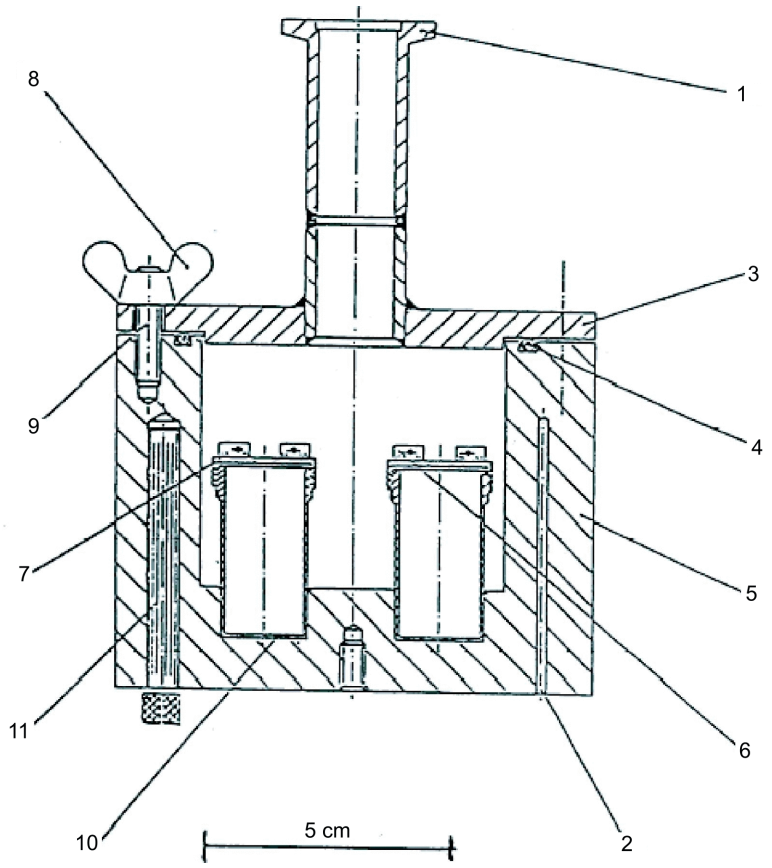
1.5.5.1. *Principiu*

Metoda se bazează pe estimarea cantității de substanță analizată care se elimină în unitatea de timp dintr-o celulă Knudsen (8) sub formă de vapori, printr-un orificiu foarte mic, în condiții de vid avansat. Cantitatea de vapori degajați se poate calcula fie prin determinarea pierderii de masă a celulei, fie prin condensarea vaporilor la temperatură joasă și determinarea cantității de substanță volatilizată prin analiză cromatografică. Presiunea de vapori se calculează prin aplicarea relației Hertz-Knudsen (a se vedea punctul 1.5.4.1) cu factori de corecție care depind de parametrii aparatului (9). Intervalul recomandat este 10^{-10}-1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Aparatură*

Principiul general al aparatului este ilustrat în figura 6.

Figura 6



1:	Conectare la vid	7:	Capac filetat
2:	Tuburi pentru termometru cu rezistență de platină sau pentru controlul și măsurarea temperaturii	8:	Piuliță tip fluture
3:	Capac pentru cuva de vid	9:	Bolțuri
4:	Garnitură de etanșare	10:	Celule de efuziune din oțel inoxidabil
5:	Cuvă de aluminiu pentru vid	11:	Cartuș caloric
6:	Dispozitiv pentru introducerea și scoaterea celulelor de efuziune		

▼M1

1.5.6. **Metoda prin efuziune: termogravimetrie izotermă**

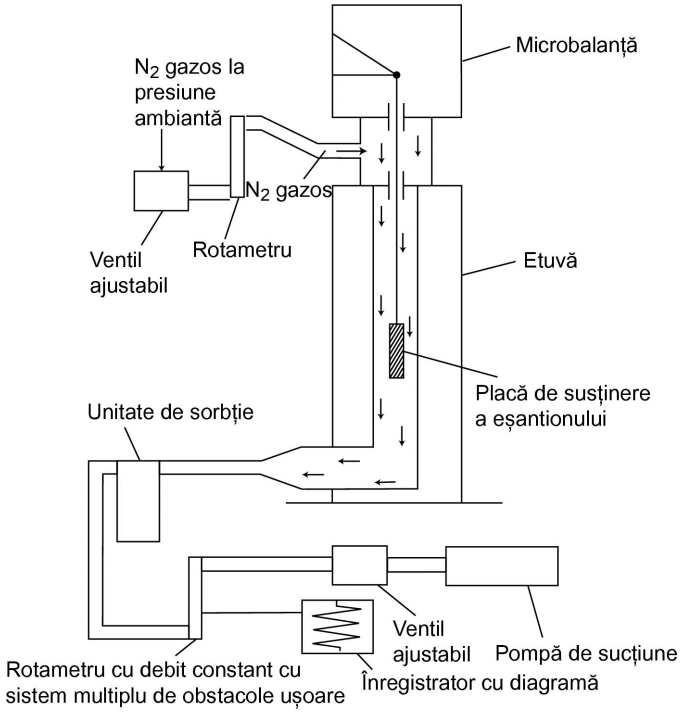
1.5.6.1. *Principiu*

Metoda se bazează pe determinarea vitezelor de evaporare accelerată pentru substanța de test la temperaturi ridicate și presiune ambiantă prin folosirea termogravimetriei (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Vitezele de evaporare v_T rezultă din expunerea compusului selectat la o atmosferă de gaz inert cu curgere lentă și monitorizarea pierderilor de masă la temperaturi definite T izoterme în kelvin la intervale de timp corespunzătoare. Presiunile de vapori p_T sunt calculate din valorile v_T prin folosirea relației liniare între logaritmul presiunii de vapori și logaritmul ratei de evaporare. Dacă este necesar, se poate face o extrapolare la temperaturi de 20 și 25 °C prin analiza regresivă a log p_T vs. 1/T. Această metodă este adecvată pentru substanțe cu presiune de vapori de până la 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) și cu o puritate cât mai apropiată de 100 % pentru a evita interpretarea eronată a pierderilor de masă măsurate.

1.5.6.2. *Aparatură*

Principiul general al configurației experimentale este ilustrat în figura 7.

Figura 7



Placa de susținere a eșantionului, suspendată de o microbalanță aflată într-un spațiu cu temperatură constantă, se află în calea unui curent de azot uscat care evacuează moleculele vaporizate ale substanței testate. După părăsirea spațiului, curentul de gaze este purificat de către o unitate de sorbție.

1.5.6.3. *Procedură*

Substanța testată se aplică pe suprafața unei plăci de sticlă rugoasă într-un strat omogen. În cazul substanțelor solide, placa se udă uniform cu o soluție a substanței într-un solvent adecvat și se usucă într-o atmosferă inertă. Pentru măsurare, placa astfel acoperită se suspendă într-un analizor termogravimetric și, ulterior, pierderea sa de masă se măsoară continuu în funcție de timp.

▼**M1**

Viteza de evaporare v_T la o temperatură dată se calculează din pierderea de masă Δm a plăcii de eșantion prin

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(\mathrm{gcm^{-2}h^{-1}} \right)$$

unde F este suprafața acoperită cu substanțele de test, în mod normal suprafața plăcii de eșantion, iar t este timpul pentru pierderea de masă Δm.

Presiunea de vapori p_T se calculează pe baza funcției vitezei de evaporare v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D \cdot \log\ v_T$$

unde C și D sunt constante specifice pentru sistemul experimental, în funcție de diametrul spațiului de măsurare și de viteza de scurgere a gazelor. Aceste constante trebuie să fie determinate o singură dată prin măsurarea unui set de compuși cu presiuni de vapori cunoscute și log p_T vs. log v_T regresiv (11)(21)(22).

Relația între presiunea de vapori p_T și temperatura T în kelvini se calculează cu ajutorul formulei

$$\mathrm{Log}\ p_T = A + B \cdot 1/T$$

unde A și B sunt constante obținute prin regresiunea log p_T vs. 1/T. Prin această ecuație, presiunea de vapori poate fi calculată prin extrapolare pentru orice altă temperatură.

1.5.7. **Metoda gazului saturat** (23)

1.5.7.1. *Principiu*

Gazul inert este trecut, la temperatura camerei și la o viteză de curgere cunoscută, prin sau peste un eșantion al substanței testate, suficient de lent pentru a fi asigurată saturarea. Atingerea saturării în faza gazoasă este deosebit de importantă. Substanța transportată se colectează, de obicei, cu ajutorul unui absorbant, cantitatea sa fiind apoi calculată. Ca alternativă la colectarea vaporilor și analizarea lor ulterioară, pentru determinarea cantității de material transportat pot fi utilizate tehnici analitice în flux, precum cromatografia în stare gazoasă. Presiunea de vapori se calculează pornind de la ipoteza că legea gazului ideal este respectată, presiunea totală a unui amestec de gaze fiind egală cu suma presiunilor gazelor componente. Presiunea parțială a substanței de test, reprezentând presiunea de vapori, se calculează din volumul total de gaz cunoscut și greutatea materialului transportat.

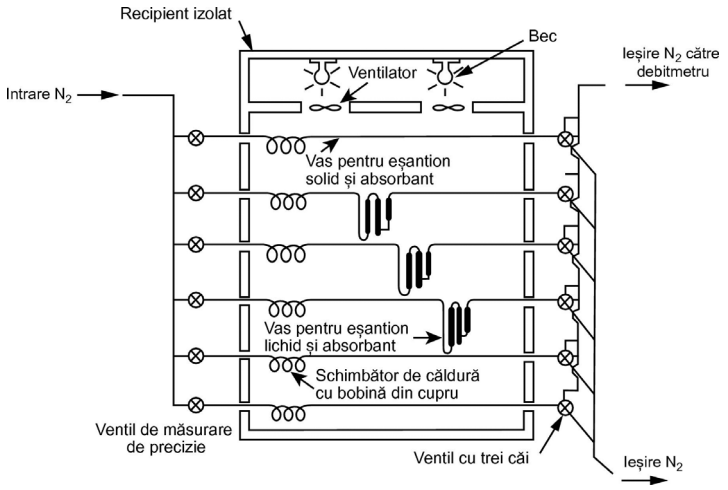
Metoda gazului saturat se aplică substanțelor chimice solide sau lichide. Poate fi folosită pentru presiuni de vapori de până la 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Metoda are eficiență maximă pentru presiuni de vapori mai mici de 10^3 Pa. Peste 10^3 Pa, presiunile de vapori sunt în general supraestimate, probabil ca urmare a formării de aerosoli. Deoarece măsurarea presiunii de vapori se face la temperatura camerei, nu este necesară extrapolarea datelor de la temperaturi mari, erorile grave provocate ca urmare a acestei extrapolări fiind astfel evitate.

1.5.7.2. *Aparatură*

Procedura necesită folosirea unui recipient izolat termic. Schița din figura 8 ilustrează un recipient conținând câte trei vase de testare pentru eșantioane de substanțe solide și substanțe lichide, ceea ce permite o analiză triplă atât a eșantionului solid, cât și a celui lichid. Temperatura este menținută constantă cu o precizie de ± 0,5 °C sau mai mare.

▼**M1**

Figura 8



În general, azotul este folosit ca gaz purtător inert, dar, ocazional, poate fi necesar un alt gaz (24). Gazul purtător trebuie să fie uscat. Curentul de gaz este divizat în 6 curente, controlate prin ventile tip ac (cu orificiu de aproximativ 0,79 mm), și curge în recipient printr-un tub de cupru cu un diametru de 3,8 mm. După echilibrarea temperaturii, gazul curge prin eșantion și separatorul absorbant și iese din recipient.

Eșantioanele solide se încarcă în tuburi de sticlă cu diametru de 5 mm, fiind amplasate între dopuri din vată de sticlă (a se vedea figura 9). Figura 10 ilustrează un suport pentru eșantion lichid și un sistem absorbant. Cea mai ușor de reprodus metodă de măsurare a presiunii de vapori a lichidelor constă în acoperirea cu lichid a unor mărgele de sticlă sau a unui absorbant inert, cum ar fi silice, iar suportul se umple cu aceste mărgele. Ca alternativă, în gazul purtător se pot introduce frită de dimensiuni mari și bule care să treacă printr-o coloană a substanței lichide de testare.

Figura 9

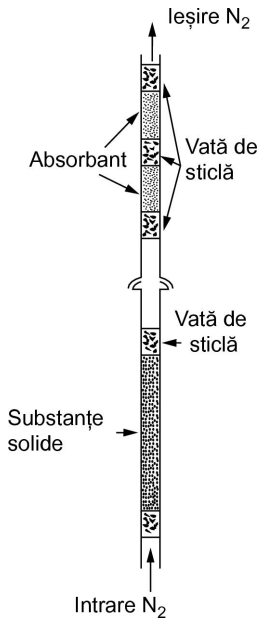
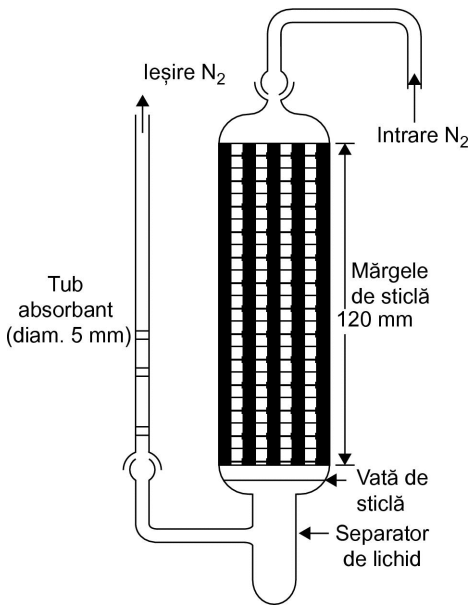


Figura 10



▼M1

Sistemul absorbant este format dintr-o secțiune frontală și o secțiune de rezervă absorbante. La presiuni de vapori foarte scăzute, absorbantul reține doar cantități mici, iar adsorbția la vata de sticlă și la tubul de sticlă dintre eșantion și absorbant poate fi serios afectată.

Separatoarele răcite cu CO_2 solid constituie o altă metodă eficientă de colectare a materialului vaporizat. Acestea nu determină o contrapresiune pe coloana de saturare, iar îndepărtarea cantitativă a materialului separat este facilă.

1.5.7.3. *Procedură*

Viteza de curgere a gazului purtător efluent se măsoară la temperatura camerei. Viteza de curgere se verifică frecvent pe parcursul experimentului pentru a fi cunoscută valoarea exactă a volumului total de gaz purtător. Se preferă monitorizarea continuă cu un debitmetru de masă. Saturația fazei gazoase poate necesita o perioadă de contact considerabil de lungă care determină, prin urmare, viteze de curgere a gazului destul de scăzute (25).

La sfârșitul experimentului, ambele secțiuni absorbante frontală și de rezervă se analizează separat. Compusul din fiecare secțiune este desorbit prin adăugarea unui solvent. Soluțiile rezultate se analizează în mod cantitativ pentru a se determina masa desorbită din fiecare secțiune. Opțiunea asupra metodei analitice (precum și opțiunea asupra absorbantului și a solventului de desorbire) este dictată de natura materialului de testat. Eficiența desorbției se determină prin injectarea unei cantități cunoscute de eșantion în absorbant, provocând desorbirea acestuia, după care se analizează cantitatea recuperată. Este important să se verifice eficiența desorbției la sau în jurul concentrației eșantionului în condițiile de testare.

În scopul asigurării saturației gazului purtător cu substanța de testat, se folosesc trei viteze de curgere diferite. Dacă presiunea de vapori calculată nu arată că este dependentă de viteza de curgere, se presupune că gazul este saturat.

Presiunea de vapori se calculează prin ecuația:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

unde:

p = presiunea de vapori (Pa)

W = masa de substanță de testat evaporată (g)

V = volumul de gaz saturat (m^3)

R = constanta universală a gazelor 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperatura (K)

M = masa molară a substanței de testat (g mol^{-1})

Volumele măsurate trebuie să fie corectate cu privire la diferențele de presiune și temperatură între debitmetru și coloana de saturație.

▼**M1**

1.5.8. **Metoda rotorului**

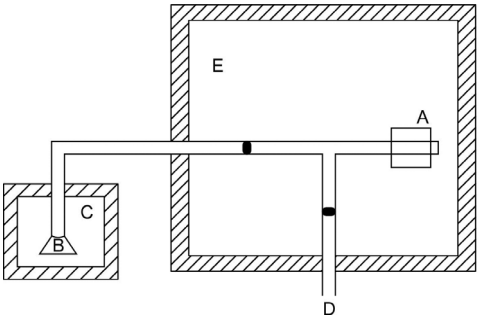
1.5.8.1. *Principiu*

Această metodă folosește un indicator de viscozitate cu rotor, în care elementul de măsurare este o bilă mică de oțel, suspendată într-un câmp magnetic, care se rotește ca urmare a rotirii câmpurilor magnetice (26)(27)(28). Bobinele de control permit măsurarea vitezei de rotire. Când bila a atins o viteză de rotație dată, de regulă aproximativ 400 de rotații pe secundă, se oprește alimentarea bobinelor și are loc o decelerare datorată frecării cu moleculele de gaz. Scăderea vitezei de rotație este măsurată în funcție de timp. Presiunea gazului este calculată din încetinirea mișcării bilei de oțel, care este dependentă de presiune. Intervalul recomandat este 10^{-4} - 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparatură*

O schiță a configurației experimentale este ilustrată în figura 11. Capul de măsurare este introdus într-o incintă cu temperatură constantă, reglată cu o abatere de 0,1 °C. Recipientul conținând eșantionul este plasat într-o incintă separată, de asemenea reglată cu o abatere de 0,1 °C. Toate celelalte părți ale configurației sunt menținute la o temperatură mai înaltă, pentru a preveni condensarea. Întregul aparat este conectat la un sistem de vid avansat.

Figura 11



A: Capul indicatorului cu rotor
B: Celulă cu eșantion
C: Termostat
D: Linie de vid (turbopompă)
E: Termostat cu aer

2. **DATE ȘI RAPORTARE**

2.1. DATE

În oricare metodă, presiunea de vapori se determină la cel puțin două temperaturi diferite. Este de preferat să se folosească trei sau mai multe temperaturi, în intervalul 0-50 °C, pentru a verifica linearitatea curbei presiunii de vapori. În cazul metodei prin efuziune (celula Knudsen și termogravimetria izotermală) și a metodei gazului saturat, pentru intervalul de temperatură se recomandă 120-150 °C, în loc de 0-50 °C.

2.2. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare include următoarele date:

— metoda folosită;

▼M1

— specificațiile precise ale substanțelor (identitate și impurități) și etapa de purificare preliminară, după caz;

— cel puțin două valori ale presiunii de vapori la temperaturi diferite – de preferință trei sau mai multe – pentru intervalul 0-50 °C (sau 120-150 °C);

— cel puțin una dintre temperaturi trebuie să fie egală cu mai mică de 25 °C, dacă este posibil din punct de vedere tehnic, în funcție de metoda aleasă;

— toate datele originale;

— o curbă log p în funcție de 1/T;

— o estimare a presiunii de vapori la 20 sau 25 °C.

Dacă se observă o transformare (schimbarea de stare, descompunere), se consemnează următoarele date:

— natura modificării;

— temperatura la care are loc transformarea corectată la presiune atmosferică;

— presiunea de vapori la 10 și 20 °C sub temperatura de tranziție și la 10 și 20 °C peste această temperatură (în afara cazului în care tranziția este de la solid la gaz).

Se consemnează toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele privitoare la impurități și starea fizică a substanței.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene* L 383 A, 26-47 (1992).

2. Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., și Vodar, B., Eds., Butterworths, Londra.

3. Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, ediția a doua, Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20-048 AFNOR (septembrie 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

6. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20-047 AFNOR (septembrie 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼**M1**

8. Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

11. Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, ediția a douăsprezecea (2000).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 nr. 1 (1987), 117-122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Partea IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Partea V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

21. Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, a optzeci și una ediție (2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

22. Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

23. 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

24. Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

25. Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G., Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

28. Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Apendice

Metoda estimării

INTRODUCERE

Valorile estimate ale presiunii de vapori pot fi folosite:

— pentru a stabili care metodă experimentală este cea optimă;

— pentru a furniza o estimare sau o valoare limită în cazul în care metoda experimentală nu poate să fie aplicată din cauza unor probleme tehnice.

METODA ESTIMĂRII

Presiunea de vapori a solidelor și lichidelor poate fi estimată folosind corelația Watson modificată (a). Singura dată experimentală necesară este punctul de fierbere în condiții normale. Metoda este aplicabilă pentru intervalul de presiune de la 10^5 Pa la 10^{-5} Pa.

Informații detailate asupra metodei se găsesc în „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (Manual de metode de estimare a proprietăților substanțelor) (b). A se vedea și OECD Environmental Monograph nr. 67 (c).

METODA DE CALCUL

Presiunea de vapori este calculată după relația:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vp}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2\,\mathrm{m}\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

unde:

T = temperatura care interesează

T_b = punct de fierbere în condiții normale

P_{VP} = presiunea de vapori la temperatura T

ΔH_{Vb} = căldura de vaporizare

ΔZ_b = factor de compresibilitate (este estimat la 0,97)

m = factor empiric depinzând de starea fizică la temperatura T

în continuare,

$$\frac{\Delta H_{vp}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

unde K_F este un factor empiric dependent de polaritatea substanței. Pentru unele tipuri de compuși, factorii K_F sunt enumerați în referința bibliografică (b).

▼**M1**

Adesea, există date disponibile pentru punctul de fierbere la presiune redusă. În asemenea situații, presiunea de vapori se calculează conform relației:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vp}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

unde T_1 este punctul de fierbere la presiunea redusă P_1.

RAPORT

În cazul în care se folosește metoda estimării, raportul de testare cuprinde o documentație cuprinzătoare a calculului utilizat.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. TENSIUNEA SUPERFICIALĂ

1. METODĂ

Majoritatea metodelor descrise se bazează pe orientările OCDE privind testele (1). Principiile fundamentale sunt menționate în referința bibliografică 2.

1.1. INTRODUCERE

Metodele descrise se aplică măsurării tensiunii superficiale a soluțiilor apoase.

Este util să se colecteze informații preliminare asupra solubilității în apă, structurii, proprietăților la hidroliză și concentrației critice pentru formarea de micelii ale substanței înainte de realizarea acestor teste.

Următoarele metode sunt aplicabile celor mai multe substanțe chimice, fără nicio restricție cu privire la gradul de puritate.

Măsurarea tensiunii superficiale prin metoda tensiometrului cu inel se limitează la soluțiile apoase cu o vâscozitate dinamică mai mică decât aproximativ 200 mPa s.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Entalpia unui lichid la suprafața de contact cu aerul raportată la unitatea de suprafață se numește tensiune superficială.

Unitățile de măsură sunt:

N/m (SI) sau

mN/m (subunitate SI)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm în sistemul CGS vechi

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Substanțele de referință care acoperă un interval larg de tensiuni superficiale sunt date în referințele 1 și 3.

1.4. PRINCIPIUL METODELOR

Metodele se bazează pe măsurarea forței maxime care este necesar să se exercite vertical pe o bridă circulară ori pe un inel aflat în contact cu suprafața lichidului dintr-un vas etalonat, pentru a-l separa de această suprafață, sau pe o placă având o margine în contact cu suprafața lichidului, pentru a ridica pelicula care s-a format.

Substanțele care sunt solubile în apă cel puțin într-o concentrație de 1 mg/l sunt analizate în soluții apoase la o singură concentrație.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Aceste metode oferă o precizie mai mare decât este probabil necesară în analizele de mediu.

▼B

1.6. DESCRIEREA METODELOR

Se prepară o soluție a substanței de testat în apă distilată. Concentrația acestei soluții reprezintă 90 % din solubilitatea de saturație a substanței în apă; când această concentrație depășește 1 g/l, pentru determinare se utilizează o concentrație de 1 g/l. Testarea substanțelor cu solubilitate în apă mai scăzută de 1 mg/l nu este necesară.

1.6.1. **Metoda cu placă**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (Agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid).

1.6.2. **Metoda cu bridă**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid)

1.6.3. **Metoda cu inel**

A se vedea ISO 304 și NFT 73-060 (Agenți activi de suprafață – determinarea tensiunii superficiale prin ridicarea unei pelicule de lichid).

1.6.4. **Metodă cu inel corelată cu principiile OCDE**

1.6.4.1. *Aparatură*

Pentru această măsurătoare sunt folosite tensiometre comerciale. Ele constau în următoarele elemente:

— porteșantion mobil;

— dinamometru;

— corp de măsurare (inel);

— vas de măsurare.

1.6.4.1.1. Porteșantionul mobil

Porteșantionul mobil se folosește ca suport al recipientului de măsurare termostatat care conține lichidul de testare. Se montează pe același soclu ca și dinamometrul.

1.6.4.1.2. Dinamometrul

Dinamometrul (a se vedea figura) se așează deasupra porteșantionului. Eroarea în măsurarea forței nu trebuie să depășească ± 10^{-6} N, echivalentul unei limite de eroare de ± 0,1 miligrame în măsurarea masei. În majoritatea cazurilor, scara de măsură a tensiometrelor comercializate este etalonată în mN/m, astfel încât se poate citi direct tensiunea superficială în mN/m, cu o precizie de 0,1 mN/m.

▼B

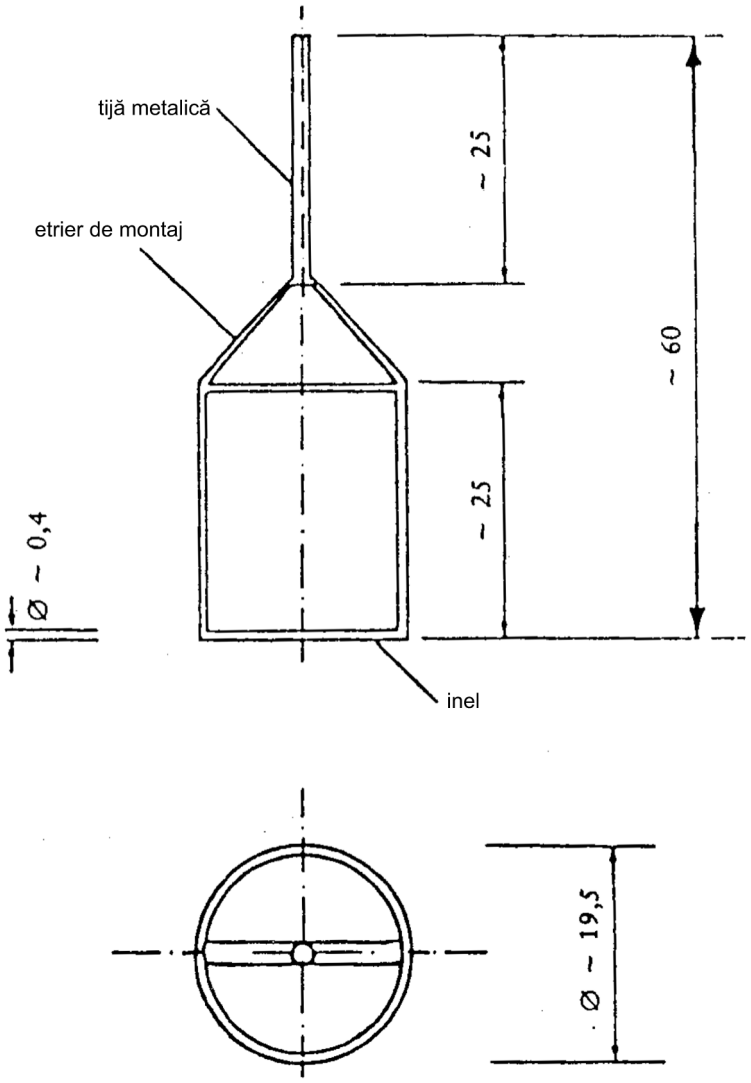
1.6.4.1.3. Corpul de măsurare (inel)

Inelul este de obicei format dintr-un film de platină sau de platină-iridiu cu o grosime de 0,4 milimetri și o circumferință de 60 milimetri. Acest inel este suspendat orizontal pe etrierul de montaj care este legat printr-o tijă metalică la dinamometru (a se vedea figura).

Figură

Corp de măsurare

(Toate dimensiunile sunt exprimate în milimetri)



1.6.4.1.4. Vasul de măsurare

Vasul de măsurare conținând proba ce urmează să fie măsurată trebuie să fie un vas de sticlă cu termostat. Acesta trebuie să fie astfel realizat încât în timpul măsurătorilor temperatura soluției de lichid și a fazei gazoase de deasupra acesteia să rămână constantă, astfel încât proba să nu se poată evapora. Sunt acceptabile vase cilindrice de sticlă cu diametrul interior mai mare de 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Pregătirea aparaturii*

1.6.4.2.1. Curățarea

Vasele de sticlă se spală cu atenție. Dacă este necesar, sunt spălate cu amestec oxidant (bicromat/acid sulfuric) cald apoi cu acid fosforic concentrat (83-98 % procent de greutate H_3PO_4), clătite cu apă și în final spălate cu apă dublu distilată până la reacție neutră, apoi uscate sau clătite cu o parte din lichidul de analizat.

Inelul este mai întâi clătit bine cu apă pentru a îndepărta orice substanță solubilă, scufundat rapid în amestec oxidant, spălat cu apă dublu distilată până la reacție neutră și în final încălzit scurt deasupra unei flăcări de metanol.

Notă:

Substanțele contaminante care nu se dizolvă și nu sunt distruse de amestecul oxidant sau de acidul fosforic, precum siliconii, vor fi îndepărtate cu ajutorul unui solvent organic potrivit.

1.6.4.2.2. Calibrarea aparatului

Validarea aparatului constă din verificarea punctului zero și corectarea acestuia astfel încât indicația instrumentului să permită realizarea unor determinări corecte în unități mN/m.

Montare:

Aparatul va fi așezat plan, de exemplu cu ajutorul unei nivele cu bulă de aer așezată la baza termometrului, prin ajustarea picioarelor mobile.

Corectarea punctului zero:

După montarea inelului pe aparat și înaintea imersării în lichid, indicația tensiometrului va fi corectată la zero, iar inelul se va verifica pentru a fi perfect paralel cu suprafața lichidului. În acest scop, suprafața lichidului poate fi folosită ca oglindă.

Calibrarea:

Testul de calibrare poate fi realizat prin una din următoarele metode:

(a) folosind o greutate: metoda folosește călăreți de masă cunoscută între 0,1 și 1,0 g amplasați pe inel. Factorul de calibrare Φ_a cu care se înmulțesc toate citirile de pe instrument se stabilește în conformitate cu ecuația (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

unde:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa călărețului (g)

g = accelerația gravitațională (981 cm s^{-2} la nivelul mării)

b = circumferința medie a inelului (cm)

σ_a = citirea tensiometrului după plasarea călărețului pe inel (mN/M);

▼B

(b) folosind apa: procedeul utilizează apa pură a cărei tensiune superficială la, de exemplu 23 °C, este egală cu 72,3 mN/m. Acest procedeu se realizează mai rapid decât calibrarea cu greutăți, dar există întotdeauna pericolul ca tensiunea superficială a apei să fie falsificată prin contaminare cu agenți tensioactivi.

Factorul de calibrare (Φ_b) cu care se înmulțesc toate citirile de pe instrument se stabilește în conformitate cu ecuația (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

unde:

σ_o = valoarea citată în literatură pentru tensiunea superficială a apei (în mN/m)

σ_g = valoarea măsurată a tensiunii superficiale a apei (mN/m) ambele la aceeași temperatură.

1.6.4.3. *Prepararea eșantioanelor*

Soluțiile apoase se prepară din substanța de testat folosind concentrația necesară în apă și nu conțin nicio substanță nedizolvată.

Soluția trebuie păstrată la o temperatură constantă (± 0,5 °C). Deoarece tensiunea superficială a unei soluții într-un vas variază în timp, se realizează măsurători la anumite intervale de timp și se trasează graficul tensiunii superficiale ca funcție de timp. Atunci când nu se mai produce nicio modificare se consideră că s-a atins starea de echilibru.

Contaminarea cu praf sau gaze din mediul înconjurător poate modifica rezultatele, așadar se va lucra sub clopot de protecție.

1.6.5. **Condiții experimentale**

Măsurătorile se efectuează la temperatura de aproximativ 20 °C controlată la ± 0,5 °C.

1.6.6. **Desfășurarea testului**

Soluțiile ce urmează să fie măsurate se transferă cu atenție într-un vas de măsurare curat, evitându-se spumarea, după care vasul de măsurare se așează pe porteșantion. Acesta se ridică până când inelul este imersat sub suprafața soluției de măsurat. Se coboară apoi treptat și uniform (la o viteză de aproximativ 0,5 cm/min) pentru desprinderea inelului de pe suprafață până la atingerea forței maxime necesare. Stratul de lichid atașat de inel trebuie să nu fie separat de inel. După terminarea măsurării, inelul se imersează din nou în lichid, iar măsurătorile se repetă până când se ajunge la o valoare constantă a tensiunii superficiale. Timpul scurs de la transferul soluției în vasul de măsurare se înregistrează pentru fiecare determinare. Citirile se efectuează la forța maximă necesară pentru desprinderea inelului de suprafața lichidului.

▼B

2. **DATE**

Pentru a calcula tensiunea superficială, valoarea citită în mN/m pe aparat este în primul rând multiplicată cu un factor de calibrare Φ_a sau Φ_b (în funcție de procedura de calibrare utilizată). Acest rezultat este aproximativ și ca urmare trebuie să fie corectat ulterior.

Harkins și Jordan (4) au determinat un factor de corecție empiric pentru valorile de tensiune superficială măsurate prin metoda cu inel, care depinde de dimensiunile inelului, densitatea lichidului și tensiunea superficială.

Deoarece determinarea factorului de corecție pentru fiecare măsurătoare individuală din tabelele lui Harkins și Jordan este laborioasă, pentru a determina tensiunea superficială la soluții apoase poate fi folosită metoda simplificată de a citi valorile corectate de tensiune superficială direct din tabel. (În cazul citirilor situate între valorile tabelate se va folosi metoda interpolării.)

Tabel

Corecția tensiunii superficiale măsurate

numai pentru soluții apoase, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (raza medie a inelului)
r	= 0,185 mm (raza sârmei inelului)

Valoare experimentală mN/m	Valoare corectată (mN/m)	
	Calibrarea greutății [a se vedea 1.6.4.2.2 (a)]	Calibrarea apei [a se vedea 1.6.4.2.2 (b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valoare experimentală mN/m	Valoare corectată (mN/m)	
	Calibrarea greutății [a se vedea 1.6.4.2.2 (a)]	Calibrarea apei [a se vedea 1.6.4.2.2 (b)]
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Acest tabel a fost realizat pe baza corecției Harkins-Jordan. Tabelul este similar cu cel din standardul DIN (DIN 53914) pentru apă și soluții apoase (ρ = 1 g/cm^3) și se referă la un inel disponibil în comerț cu diametru de R = 9,55 mm (însemnând raza medie a inelului) și r = 0,185 mm (raza sârmei inelului). Tabelul conține valori corectate pentru măsurătorile de tensiune superficială făcute după calibrarea cu greutăți sau cu apă.

Alternativ, în absența procedurii de calibrare, tensiunea superficială poate să fie calculată conform formulei:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

unde:

F = forța măsurată la dinamometru la întreruperea filmului

R = raza inelului

f = factor de corecție (1)

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele date:

— metoda folosită;

— tipul de apă sau soluție folosită;

— specificațiile precise ale substanțelor (identitate, impurități);

— rezultatele măsurătorii: tensiune superficială (citire) menționând citiri individuale și media lor aritmetică, precum și media corectată (luând în considerare factorul de echipament și tabelul cu factorii de corecție);

▼B

— concentrația soluției;

— temperatura de testare;

— vechimea soluției folosite; în particular timpul scurs între prepararea și măsurarea soluției;

— descrierea tensiunii superficiale ca funcție de timp după transferul soluției la vasul de măsurare;

— toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor ce urmează a fi raportate, în special cu privire la impurități și starea fizică a substanței.

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Având în vedere că apa distilată are tensiunea superficială de 72,75 mN/m la 20 ^{o}C, substanțele prezentând o tensiune superficială mai scăzută de 60 mN/m în condițiile acestei metode sunt considerate ca fiind agenți activi de suprafață.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter XIV.

3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.

4. Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

▼M4

A.6. SOLUBILITATEA ÎN APĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 105 (1995) a OCDE. Această metodă de testare este o versiune revizuită a Orientării 105 originale, care a fost adoptată în 1981. Nu există nicio diferență de substanță între versiunea curentă și cea din 1981. A fost modificat, în principal, formatul. Revizuirea s-a bazat pe metoda de testare UE „Solubilitatea în apă” ([1]).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

2. Solubilitatea în apă a unei substanțe poate fi considerabil afectată de prezența impurităților. Această metodă de testare abordează determinarea solubilității în apă a substanțelor în esență pure care sunt stabile în apă și nu sunt volatile. Pentru determinarea solubilității în apă sunt necesare anumite informații preliminare referitoare la substanța testată, cum ar fi formula structurală, presiunea de vapori, constanta de disociere și hidroliza în funcție de pH.

3. În această metodă de testare sunt descrise două metode, cea a eluției pe coloană și metoda flaconului, care acoperă solubilități sub, respectiv peste 10^{-2} g/l. Este descris, de asemenea, un test preliminar simplu. El permite determinarea cantității adecvate aproximative de probă folosite în testul final, precum și a timpului necesar pentru atingerea saturației.

DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

4. Solubilitatea în apă a unei substanțe reprezintă concentrația masică de saturație a substanței în apă la o temperatură dată.

5. Solubilitatea în apă este exprimată ca masa de solut raportată la volumul de soluție. Unitatea SI este kg/m^3, dar se poate folosi și g/l.

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

6. Nu este necesar să se folosească substanțe chimice de referință în toate cazurile în care se studiază o substanță testată.

DESCRIEREA METODELOR

Condițiile de testare

7. De preferință, testul se efectuează la 20 ± 0,5 °C. Temperatura aleasă trebuie să fie menținută constantă în toate părțile relevante ale echipamentului.

Testul preliminar

8. În cadrul unei proceduri secvențiale, se adaugă volume tot mai mari de apă la temperatura camerei, la aproximativ 0,1 g probă (substanțele testate solide se pulverizează) într-un cilindru gradat de 10 ml cu dop din sticlă. După fiecare adăugare a unei cantități de apă, amestecul este agitat timp de 10 minute și examinat vizual pentru a observa dacă există părți nedizolvate din probă. Dacă, după adăugarea a 10 ml de apă, proba sau părți din ea rămân nedizolvate, experimentul este continuat într-un cilindru gradat de 100 ml. Solubilitatea aproximativă este indicată în tabelul 1, sub volumul de apă

▼M4

adăugată la care are loc dizolvarea completă a probei. În cazul în care solubilitatea este redusă, poate fi necesar un timp îndelungat pentru dizolvarea substanței testate și trebuie să se lase să treacă cel puțin 24 de ore. Dacă după 24 de ore substanța testată nu este încă dizolvată, se lasă mai mult timp (maximum 96 de ore) sau se încearcă diluarea în continuare, pentru a stabili dacă trebuie folosită metoda eluției pe coloană sau metoda flaconului.

Tabelul 1

ml apă pentru 0,1 g solubil	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilitate aproximativă în g/l	> 1 000	1 000 până la 200	200 până la 100	100 până la 50	50 până la 10	10 până la 1	< 1

Metoda eluției pe coloană

Principiu

9. Această metodă se bazează pe eluția substanței testate cu apă dintr-o micro-coloană încărcată cu un suport inert, acoperită în prealabil în exces cu substanța testată (2). Solubilitatea în apă este dată de concentrația masică a eluatului atunci când aceasta a atins un platou, ca funcție de timp.

Aparatură

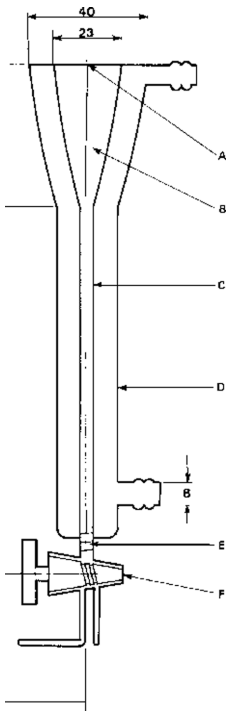
10. Aparatura constă într-o microcoloană (figura 1), menținută la temperatură constantă. Ea este conectată la o pompă de recirculare (figura 2) sau la un vas de nivel (figura 3). Microcoloana conține un suport inert menținut pe poziție de un mic dop din vată de sticlă, care servește, de asemenea, la filtrarea particulelor. Ca suport se pot utiliza mărgelele de sticlă, pământul de diatomee sau alte materiale inerte.

11. Microcoloana prezentată în figura 1 este adecvată pentru configurația cu pompă de recirculare. Ea are un spațiu liber pentru cinci volume (eliminate la începutul experimentului) și volumul a cinci probe (prelevate pentru analiză în timpul experimentului). Ca alternativă, dimensiunea poate fi redusă dacă se poate adăuga apă în sistem în timpul experimentului pentru a înlocui cele cinci volume inițiale îndepărtate cu impuritățile. Coloana este conectată, prin intermediul unor tuburi dintr-un material inert, la pompa de recirculare, capabilă să asigure un debit de aproximativ 25 ml/h. Pompa de recirculare poate fi, de exemplu, o pompă peristaltică sau cu membrană. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita contaminarea și/sau adsorbția în contact cu materialul tuburilor.

12. O configurație schematică ce utilizează un vas de nivel este prezentată în figura 3. În această configurație, microcoloana este prevăzută cu un robinet cu o cale. Conectarea la vasul de nivel se face prin intermediul unei îmbinări din sticlă rodată și a unor tuburi dintr-un material inert. Debitul de la vasul de nivel trebuie să fie de aproximativ 25 ml/h.

▼**M4**

Figura 1



Dimensiuni, în mm

A. Racord pentru îmbinarea din sticlă rodată

B. Spațiu liber

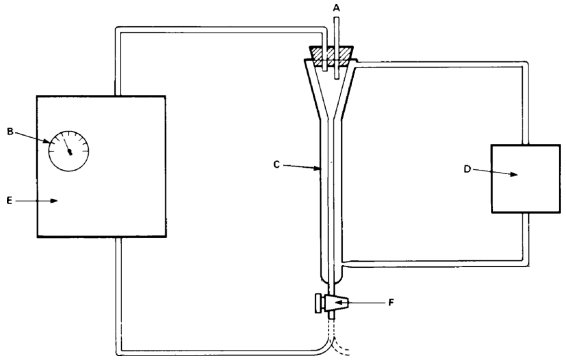
C. Diametru interior 5

D. Diametru exterior 19

E. Dop din vată de sticlă

F. Robinet

Figura 2



A. Echilibrare atmosferică

B. Debitmetru

C. Microcoloană

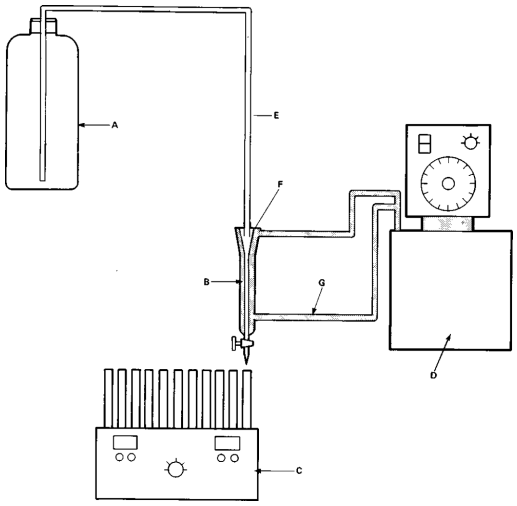
D. Pompă de circulație termostatată

E. Pompă de recirculare

F. Robinet cu două căi pentru prelevare probe

▼M4

Figura 3



A. Vas de nivel (de exemplu, balon de 2,5 litri)

B. Coloană

C. Colector de fracțiuni

D. Termostat

E. Tub de teflon

F. Îmbinare din sticlă rodată

G. Conductă de apă (între termostat și coloană, diametrul interior aproximativ 8 mm)

13. Aproximativ 600 mg din materialul-suport sunt transferate într-un balon de 50 ml cu fund rotund. O cantitate adecvată de substanță testată se dizolvă într-un solvent volatil cu o calitate de reactiv analitic și o cantitate corespunzătoare din această soluție se adaugă la materialul-suport. Solventul este evaporat complet, de exemplu prin folosirea unui evaporator rotativ, deoarece, în caz contrar, saturația cu apă a suportului nu s-ar atinge în timpul etapei de eluție, din cauza partiției la suprafață. Suportul încărcat se lasă să se îmbibe timp de două ore în aproximativ 5 ml de apă, apoi suspensia se adaugă în microcoloană. Ca alternativă, suportul uscat poate fi introdus în microcoloana care a fost deja umplută cu apă și apoi lăsat timp de aproximativ 2 ore, până la atingerea echilibrului.

14. Încărcarea suportului poate genera probleme, conducând la rezultate eronate, de exemplu dacă substanța testată este depusă ca fază uleioasă. Aceste probleme trebuie să fie examinate și să se consemneze detaliile.

Procedura cu pompă de recirculare

15. Se pornește circulația prin coloană. Se recomandă utilizarea unui debit de aproximativ 25 ml/h, corespunzând la 10 volume pe oră pentru coloana descrisă. Cel puțin primele cinci volume se elimină, pentru a îndepărta impuritățile solubile în apă. Apoi, pompa de recirculare se lasă să funcționeze până la stabilirea echilibrului, care este definit prin 5 probe succesive ale căror concentrații nu diferă cu mai mult de ± 30 %, în mod aleatoriu. Aceste probe sunt separate între ele prin intervale de timp corespunzătoare trecerii a cel puțin 10 volume. În funcție de metoda analitică folosită, poate fi preferabil să se realizeze o curbă concentrație/timp, pentru a indica atingerea echilibrului.

▼M4

Procedura cu vas de nivel

16. Fracțiuni succesive de eluat se colectează și se analizează prin metoda aleasă. Pentru a determina solubilitatea, se folosesc acele fracțiuni din intervalul de eluție mediu, unde concentrațiile sunt constante în limita a ± 30 % pentru cel puțin 5 fracțiuni consecutive.

17. Apa dublu distilată este eluentul preferat. Se poate folosi și apă deionizată cu o rezistivitate peste 10 MΩcm și un conținut de carbon organic total sub 0,01 %.

18. În cadrul ambelor proceduri, o a doua serie se efectuează la jumătate din debitul primei serii. Dacă rezultatele celor două serii sunt în concordanță, testul este satisfăcător. Dacă solubilitatea măsurată este mai mare la debitul mai mic, atunci înjumătățirea debitului va trebui să continue până când se va obține aceiași solubilitate în două serii succesive.

19. În ambele proceduri, fracțiunile se verifică pentru a decela prezența de particule coloidale, prin examinarea efectului Tyndall. Prezența unor particule invalidează testul și acesta se repetă după îmbunătățirea acțiunii de filtrare a coloanei.

20. Se măsoară pH-ul fiecărei probe, preferabil folosind benzi indicatoare speciale.

Metoda prin solubilitate în flacon

Principiu

21. Substanța testată (solidele se pulverizează) se dizolvă în apă la o temperatură puțin mai mare decât temperatura de testare. Când se atinge saturația, amestecul se răcește și se păstrează la temperatura de testare. Ca alternativă, determinarea poate fi efectuată direct la temperatura de testare, dacă se asigură, prin prelevare de probe adecvată, faptul că s-a atins starea de echilibru de saturație. Apoi se determină, printr-o metodă analitică adecvată (3), concentrația masică a substanței testate în soluția apoasă, care nu trebuie să conțină niciun fel de particule nedizolvate.

Aparatură

22. Sunt necesare următoarele materiale:

— sticlărie și instrumente obișnuite de laborator;

— un dispozitiv pentru agitarea soluțiilor la temperatură constantă controlată;

— o centrifugă (preferabil termostatată), dacă este necesar în cazul emulsiilor; și

— echipament de analiză.

Procedură

23. Cantitatea de substanță testată necesară pentru a satura volumul de apă dorit este estimată printr-un test preliminar. Aproximativ de cinci ori din acea cantitate este cântărită în fiecare dintre cele trei vase de sticlă prevăzute cu dopuri de sticlă (de exemplu, eprubete pentru centrifugă, flacoane). În fiecare vas se adaugă un volum de apă, ales în funcție de metoda analitică și de domeniul de solubilitate. Vasele sunt închise etanș și apoi agitate la 30 °C. Se folosește un dispozitiv de agitare sau de amestecare ce poate funcționa la temperatură constantă, de exemplu, un agitator magnetic într-o baie de apă termostatată. După o zi, unul dintre vase este lăsat timp de 24 de ore la temperatura de testare, pentru echilibrare, agitându-l din când în când. Conținutul vasului este apoi centrifugat la temperatura de testare și se

▼M4

determină concentrația de substanță testată în faza apoasă limpede, printr-o metodă analitică adecvată. Celelalte două flacoane sunt tratate similar, după atingerea echilibrului inițial la 30 °C timp de 2, respectiv 3 zile. În cazul în care concentrațiile măsurate cel puțin în ultimele două vase nu diferă cu mai mult de 15 %, testul este considerat satisfăcător. Întregul test se repetă, folosind durate de echilibrare mai lungi, dacă rezultatele de la vasele 1, 2 și 3 prezintă o tendință de creștere a valorilor.

24. Testul se poate efectua, de asemenea, fără preincubare la 30 °C. Pentru a estima durata necesară stabilirii echilibrului de saturație, se prelevează probe până în momentul în care timpul de agitare nu mai influențează concentrațiile măsurate.

25. Se măsoară pH-ul fiecărei probe, preferabil folosind benzi indicatoare speciale.

Determinări analitice

26. Pentru aceste determinări se preferă o metodă analitică specifică substanței, deoarece cantități mici de impurități solubile pot genera erori mari la măsurarea solubilității. Exemple de astfel de metode sunt: cromatografia în fază gazoasă sau lichidă, titrarea, fotometria, voltametria.

DATE ȘI RAPORT

Date

Metoda eluției pe coloană

27. Pentru fiecare serie, se vor calcula valoarea medie și deviația standard obținută de la cel puțin cinci probe consecutive prelevate în zona platoului de saturație. Valorile medii obținute din două teste cu debite diferite nu trebuie să difere cu peste 30 %.

Metoda prin solubilitate în flacon

28. Se face media rezultatelor individuale de la fiecare dintre cele trei flacoane, care nu trebuie să difere cu mai mult de 15 %.

Raport de testare

Metoda eluției pe coloană

29. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

— rezultatele testului preliminar;

— identitatea chimică și impurități (etapă de purificare preliminară, dacă este cazul);

— concentrațiile, debitele și pH-ul pentru fiecare probă;

— mediile și deviațiile standard de la cel puțin cinci probe din zona platoului de saturație pentru fiecare testare;

— media a cel puțin două testări succesive;

— temperatura apei în timpul procesului de saturație;

— metoda de analiză;

— natura suportului utilizat;

— cantitatea de substanță depusă pe suport;

— solventul folosit;

— dovezi despre orice instabilitate chimică a substanței în timpul testării;

— toate informațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special referitoare la impurități și starea fizică a substanței testate.

▼**M4**

Metoda prin solubilitate în flacon

30. Raportul de testare include următoarele date:

— rezultatele testului preliminar;

— identitatea chimică și impurități (etapă de purificare preliminară, dacă este cazul);

— determinările analitice individuale și media lor, acolo unde a fost determinată mai mult decât o valoare pentru fiecare flacon;

— pH-ul fiecărei probe;

— media valorilor pentru flacoanele diferite aflate în concordanță;

— temperatura de testare;

— metoda analitică;

— dovezi despre orice instabilitate chimică a substanței în timpul testului;

— toate informațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special referitoare la impurități și starea fizică a substanței testate.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Directiva 92/69/CEE a Comisiei din 31 iulie 1992 de efectuare a celei de-a șaptezecea adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea și etichetarea substanțelor periculoase (JO L 383, 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985), Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985), Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE

1. METODĂ

Metoda „agitării flaconului” descrisă se bazează pe orientările OCDE privind testele (1).

1.1. INTRODUCERE

Pentru efectuarea acestui test este util să se colecteze informații preliminare despre formula structurală, constanta de disociere, solubilitatea în apă, hidroliză, solubilitatea în n-octanol și tensiunea superficială a substanței.

Măsurătorile se fac pe substanțe ionizabile, numai în forma lor neionizată (acizi liberi și baze libere) produse prin folosirea unei soluții tampon adecvate, cu un pH de cel puțin o unitate de mai mic (acizi liberi) sau mai mare (baze libere) decât pK.

Această metodă de analiză include două metode separate: metoda „agitării flaconului” și cromatografia lichidă de mare performanță (HPLC). Prima este aplicabilă când valoarea log P_{ow} (pentru definiții a se vedea mai jos) este în intervalul de la – 2 la 4, iar cea de-a doua în intervalul de la 0 la 6. Înainte de a aplica oricare dintre metodele experimentale se obține o estimare a coeficientului de partiție.

Metoda agitării flaconului se aplică numai substanțelor pure solubile în apă și în n-octanol. Nu este aplicabilă agenților tensioactivi (pentru care se furnizează o valoare calculată sau estimată a solubilității individuale în apă și n-octanol).

Metoda HPLC nu este aplicabilă acizilor și bazelor puternice, complecșilor metalici, agenților tensioactivi sau substanțelor care reacționează cu eluentul. Pentru aceste materiale se furnizează valori calculate sau estimate ale solubilității individuale în apă și n-octanol.

Metoda HPLC este mai puțin sensibilă la prezența impurităților din probă decât metoda agitării flaconului. Cu toate acestea, în unele cazuri impuritățile pot face interpretarea rezultatelor dificilă pentru că identificarea picurilor devine incertă. Pentru amestecuri care dau o bandă imprecisă se menționează limitele superioară și inferioară ale log P.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Coeficientul de partiție (P) este definit ca raportul dintre concentrațiile de echilibru (c_i) ale substanței dizolvate în sistemul bifazic constând din doi solvenți aproape nemiscibili. În cazul n-octanol și apă:

$$p_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Coeficientul de partiție (P) este prin urmare raportul dintre două concentrații și de regulă este exprimat ca logaritm în baza 10 (log P).

▼B

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Metoda agitării flaconului

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode.

Metoda HPLC

Pentru a corela datele despre un compus determinate prin HPLC cu valoarea sa P, trebuie stabilit un grafic de calibrare log P vs. date cromatografice, folosind cel puțin 6 puncte de referință. Utilizatorul trebuie să selecteze substanțele de referință adecvate. Dacă este posibil, cel puțin un compus de referință trebuie să aibă P_{ow} mai ridicat decât substanța de testat și un altul – un P_{ow} mai scăzut decât eșantionul. Pentru valorile log P mai mici de 4, calibrarea se poate baza pe datele obținute prin metoda agitării flaconului. Pentru valori log P mai mari de 4, calibrarea se poate baza pe valori recunoscute din literatură, dacă acestea sunt în concordanță cu valorile calculate. Pentru o mai mare acuratețe, este preferabil să se aleagă compuși de referință care sunt înrudiți structural cu substanța de testat.

Este disponibilă o listă exhaustivă de valori pentru log P_{ow} pentru mai multe grupe de substanțe chimice (2) (3). Dacă nu sunt disponibile date despre coeficienții de partiție ai compușilor înrudiți structural, atunci poate fi folosită o calibrare mai generală, stabilită cu alți compuși de referință.

În apendicele 2 figurează o listă a substanțelor de referință recomandate care cuprinde și valori pentru P_{ow}.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

1.4.1. **Metoda agitării flaconului**

Pentru a determina coeficientul de partiție trebuie realizat echilibrul între toți componenții sistemului care interacționează și trebuie determinate concentrațiile substanțelor dizolvate în cele două faze. Un studiu asupra literaturii de specialitate dedicată acestui subiect indică mai multe tehnici diferite ce pot fi folosite pentru rezolvarea acestei probleme, de exemplu prin amestecarea completă a două faze urmată de separarea lor pentru a determina concentrația de echilibru a substanței.

1.4.2. **Metoda HPLC**

HPLC este efectuat într-o coloană analitică umplută cu o fază solidă disponibilă în comerț care conține lanțuri lungi de hidrocarburi (de exemplu C_8, C_{18}) legate chimic pe silice. Substanțele injectate într-o astfel de coloană se mișcă de-a lungul ei cu diferite viteze din cauza gradelor diferite de partiție între faza mobilă și faza staționară cu hidrocarburi. Eluția amestecurilor de substanțe se face în funcție de caracterul hidrofob, substanțele solubile în apă fiind eluate mai întâi și cele solubile în solvenți organici eluate ultimele, proporțional cu coeficientul lor de partiție hidrocarbură/apă. Aceasta face posibilă să fie stabilită relația dintre timpul de retenție pe o astfel de coloană (faza inversă) și coeficientul de partiție n-octanol/apă ce trebuie determinat. Coeficientul de partiție este dedus din *factorul de capacitate* k, dat de:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

în care t_r = timpul de retenție al substanței de testat și t_o = timpul mediu necesar unei molecule de solvent pentru a trece prin coloană (timp mort).

Nu sunt necesare metode analitice cantitative, ci doar determinarea timpilor de eluție.

1.5. CRITERII DE CALITATE

1.5.1. **Repetabilitatea**

Metoda agitării flaconului

Pentru a asigura acuratețea măsurătorii coeficientului de partiție trebuie realizate determinări duble în trei condiții de testare diferite, prin care cantitatea de substanță utilizată, precum și raportul volumelor de solvent poate fi variat. Valorile determinate ale coeficientului de partiție exprimate logaritmic vor fi în intervalul ± 0,3 unități logaritmice.

Metoda HPLC

Pentru a crește coeficientul de încredere al măsurătorilor, trebuie să fie făcute determinări duble. Valorile pentru log P derivate din măsurătorile individuale vor fi în intervalul ± 0,1 unități logaritmice.

1.5.2. **Sensibilitate**

Metoda agitării flaconului

Intervalul de aplicabilitate al metodei este determinat de limita de detectare a metodei analitice. Aceasta trebuie să permită evaluarea valorilor log P_{ow} în intervalul de la – 2 la 4 (ocazional, când condițiile impun acest lucru, acest interval poate fi extins pentru log P_{ow} până la 5) când concentrația solutului în oricare fază nu este mai mare de 0,01 mol pe litru.

Metoda HPLC

Metoda HPLC face posibilă estimarea coeficienților de partiție în intervalul 0 până la 6 pentru log P_{ow}.

În mod normal, coeficientul de partiție al unui compus poate fi estimat cu o eroare de ±1 unitate logaritmică față de valoarea determinată prin metoda agitării flaconului. Corelații tipice pot se găsesc în literatura de specialitate (4) (5) (6) (7) (8). O mai mare acuratețe poate fi obținută în mod normal când graficele de corelare se bazează pe compuși de referință înrudiți structural (9).

▼B

1.5.3. **Specificitate**

Metoda agitării flaconului

Legea partiției a lui Nernst se aplică numai la temperatură, presiune și pH constante pentru soluții diluate. Ea se aplică strict unei substanțe pure dispersată între doi solvenți puri. Dacă sunt prezenți diferiți soluți în una sau în ambele faze în același timp, aceasta poate afecta rezultatele.

Disocierea sau asocierea moleculelor dizolvate duce la deviații de la legea partiției a lui Nernst. Astfel de deviații sunt indicate de funcția care descrie dependența coeficientului de partiție de concentrația soluției.

Întrucât presupune echilibre multiple, această metodă nu se folosește în cazul compușilor ionizabili fără a aplica o corecție. Pentru astfel de compuși se ia în considerare folosirea soluțiilor tampon în locul apei; pH-ul soluției tampon trebuie să difere cu cel puțin 1 unitate de pKa-ul substanței ținând seama și de semnificația acestui pH pentru mediu.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Estimarea preliminară a coeficientului de partiție**

Coeficientul de partiție este estimat de preferință prin calcul (a se vedea apendicele 1) sau, acolo unde este posibil, prin raportul solubilităților substanței testate în solvenți puri (10).

1.6.2. **Metoda agitării flaconului**

1.6.2.1. *Pregătire*

n-Octanol: Determinarea coeficientului de partiție va fi efectuată cu reactivi de puritate analitică ridicată.

Apă: se folosește apă distilată sau dublu distilată în aparate din sticlă sau cuarț. Dacă este cazul, pentru compușii ionizabili vor fi folosite în locul apei soluții tampon.

Notă:

Nu se folosește apa luată direct dintr-un aparat cu schimbători de ioni.

1.6.2.1.1. Presaturarea solvenților

Înaintea determinării coeficientului de partiție, fazele sistemului de solvent sunt saturate reciproc prin agitare la temperatura de testare. În acest scop, de obicei se agită două sticle mari cu n-octanol de puritate analitică sau apă, fiecare cu o cantitate suficientă din celălalt solvent, timp de 24 de ore, cu un agitator mecanic, apoi se lasă suficient de mult timp pentru a permite fazelor să se separe și pentru a realiza o stare de saturație.

▼B

1.6.2.1.2. Pregătirea testului

Întregul volum al sistemului bifazic trebuie să umple aproape total vasul de testare. Aceasta va ajuta la prevenirea pierderilor de material datorită volatilizării. Raportul volumelor și cantitățile de substanță ce vor fi folosite sunt fixate prin următoarele condiții:

— evaluarea preliminară a coeficientului de partiție (a se vedea mai sus);

— cantitatea minimă din substanța de testat necesară la determinările analitice; și

— limita concentrației maxime în fiecare fază este de 0,01 mol pe litru.

Sunt efectuate 3 măsurători. În prima este folosit raportul de volume n-octanol/apă calculat; în a doua măsurătoare acest raport se împarte la 2; în a treia acest raport înmulțește cu 2 (de exemplu 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Substanța de testat

O soluție mamă este preparată în n-octanol presaturat cu apă. Concentrația acestei soluții mamă va fi determinată cu precizie înaintea folosirii ei pentru stabili coeficientului de partiție. Această soluție va fi depozitată în condiții care să-i asigure stabilitatea.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

Temperatura de testare se menține constantă (± 1 ^{o}C) și se află în intervalul 20-25 ^{o}C.

1.6.2.3. *Procedeul de măsurare*

1.6.2.3.1. Stabilirea echilibrului de partiție

Pentru fiecare dintre condițiile de testare se pregătesc două vase de testare conținând cantitățile necesare, precis măsurate din cei doi solvenți, împreună cu cantitatea necesară din soluția mamă.

Fazele cu n-octanol vor fi măsurate volumetric. Vasele de testare sunt amplasate într-un agitator adecvat sau sunt agitate în mână. Când se folosește un tub de centrifugă, o metodă recomandată este aceea să se rotească acest tub repede într-o direcție aflată la 180^{o} față de axa sa transversală, astfel încât aerul captat să se ridice prin cele două faze. Experiența a arătat că 50 de astfel de rotații sunt de regulă suficiente pentru stabilirea partiției de echilibru. Pentru siguranță se recomandă 100 de rotații în 5 minute.

1.6.2.3.2. Separarea fazelor

Dacă este necesar, se efectuează centrifugarea amestecului pentru a separa fazele. Acest lucru se desfășoară într-o centrifugă de laborator menținută la temperatura camerei sau, dacă este folosită o centrifugă netermostatată, tuburile centrifugei se păstrează pentru echilibrare la temperatura de testare cel puțin o oră înainte de analiză.

▼B

1.6.2.4. *Analiza*

Pentru determinarea coeficientului de partiție este necesară determinarea concentrațiilor de substanță analizată în ambele faze. Aceasta poate fi făcută prin prelevarea unei probe alicote din fiecare din cele două faze din fiecare tub pentru fiecare condiție de testare și analizarea lor prin metoda aleasă. Cantitatea totală de substanță prezentă în ambele faze se calculează și se compară cu cantitatea de substanță introdusă la început.

Faza apoasă este eșantionată printr-o operațiune care reduce la minim riscul includerii unor urme de n-octanol: o seringă de sticlă cu ac detașabil poate fi folosită pentru a lua probe din faza apoasă. Inițial, seringa se umple parțial cu aer. Aerul se elimină cu atenție în timp ce se introduce acul prin stratul de n-octanol. Un volum corespunzător din faza apoasă este tras în seringă. Seringa se scoate repede din soluție și acul se detașează. Conținutul seringii poate fi apoi folosit ca probă apoasă. Concentrația în cele două faze separate este determinată de preferință printr-o metodă specifică substanței. Exemple de metode analitice adecvate sunt:

— metode fotometrice;

— cromatografia cu gaz;

— cromatografia lichidă de înaltă performanță.

1.6.3. **Metoda HPLC**

1.6.3.1. *Pregătire*

Aparatură

Este necesar un cromatograf de lichide la care s-a atașat o pompă fără pulsații și un instrument de detecție adecvat. Este recomandată folosirea unei valve de injecție cu bucle de injecție. Prezența grupelor polare în faza staționară poate diminua serios performanțele coloanei HPLC. Prin urmare, faza staționară va avea un procent minim de grupe polare (11). Pot fi folosite umpluturi de microparticule pentru inversarea fazelor sau coloane gata umplute. O coloană de gardă poate fi poziționată între sistemul de injecție și coloana analitică.

Faza mobilă

Pentru a prepara solventul de eluție se folosește metanol grad HPLC și apă de puritate HPLC; solventul este degazat înainte de folosire. Se folosește eluția izocratică. Se utilizează un raport metanol/apă cu un conținut minim de apă de 25 %. În general, un amestec metanol-apă 3:1 este satisfăcător pentru eluția compușilor cu log P 6 într-o oră, la un debit de 1 ml/minut. Pentru compușii cu log P mare poate fi necesar să se scurteze timpul de eluție (și cel al compușilor de referință) prin descreșterea polarității fazei mobile sau a lungimii coloanei.

Substanțele cu solubilitate foarte scăzută în n-octanol tind să dea valori neobișnuit de mici pentru log P_{ow} prin metoda HPLC; picurile unor astfel de compuși însoțesc uneori frontul de solvent. Aceasta se datorează probabil faptului că procesul de partiție este prea lent pentru a atinge echilibrul în timpul necesar în mod normal pentru o separare. Scăderea debitului și/sau micșorarea raportului metanol/apă poate fi o măsură eficientă pentru a ajunge la o valoare fiabilă.

▼B

Compușii de testare și compușii de referință trebuie să fie solubili în faza mobilă într-o concentrație suficientă pentru a permite detectarea lor. Numai în cazuri excepționale pot fi folosiți aditivi împreună cu amestecul metanol-apă, deoarece aditivii vor schimba proprietățile coloanei. Pentru cromatograme cu aditivi este obligatoriu să se folosească o coloană separată de același tip. Dacă amestecul metanol-apă nu este corespunzător, pot fi folosite alte amestecuri solvent organic-apă, de exemplu etanol-apă sau acetonitril-apă.

PH-ul eluentului este un factor critic pentru compușii ionizabili. Trebuie să fie în intervalul de pH al coloanei, care este de obicei cuprins între 2 și 8. Este recomandabilă tamponarea. Se evită atent precipitarea sărurilor și deteriorarea coloanei în cazul unor amestecuri fază organică-soluție tampon. Măsurătorile HPLC cu fază staționară de silicagel nu sunt recomandabile în cazul unui pH mai mare de 8 deoarece folosirea unei faze mobile alcaline poate cauza scăderea rapidă a performanțelor coloanei.

Soluții

Compușii de referință sunt cei mai puri disponibili. Dacă este posibil, compușii care sunt folosiți în scopuri de testare sau calibrare se dizolvă în faza mobilă.

Condiții experimentale

În timpul măsurătorilor, temperatura nu variază cu mai mult de ± 2 K.

1.6.3.2. **Măsurători**

Calcularea timpului mort t_0

Timpul mort t_0 poate fi determinat prin folosirea unei serii omoloage (de exemplu n-alchil metil cetone) sau compuși organici care nu se absorb pe coloană (de exemplu tioureea sau formamida). Pentru calcularea timpului mort t_0 prin folosirea unei serii omoloage, un set de cel puțin 7 membri ai seriei omoloage este injectat și sunt determinați timpii respectivi de retenție. Timpii retenției brute $t_{r(nc+1)}$ sunt reprezentați ca funcție de $t_{r(nc)}$ și sunt determinate constanta a și panta b a ecuației de regresie:

$$t_{r\ (nc\ +\ 1)} = a + b\ t_{r\ (nc)}$$

(nc = numărul de atomi de carbon).Timpul mort t_0 este dat de:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

Graficul de calibrare

Următorul pas este trasarea graficului de corelație între valorile lui log k și log P pentru compușii de referință. În practică, un set de 5 până la 10 compuși de referință standard al căror log P se găsește în limitele intervalului preconizat se injectează simultan și se determină timpii de retenție, preferabil cu un înregistrator conectat la sistemul de detecție. Se calculează logaritmii corespunzători ai factorilor de capacitate, log k, și se trasează graficul funcției log P determinat prin metoda agitării flaconului. Calibrarea se execută la intervale egale, cel puțin o dată pe zi, așa încât să se poată ține seama de posibilele schimbări în performanțele coloanei.

Determinarea factorului de capacitate al substanței de testat

Proba este injectată într-o cantitate cât mai mică posibil de fază mobilă. Se determină timpul de retenție (în duplicat), permițând calcularea factorului de capacitate k. Din graficul de corelare al compușilor de referință poate fi interpolat coeficientul de partiție al substanței de testat. Pentru coeficienții de partiție foarte mici și pentru cei foarte mari, este necesară extrapolarea. În aceste cazuri particulare trebuie să se acorde atenție limitelor de încredere ale liniei de regresie.

2. **DATE**

Metoda agitării flaconului

Fiabilitatea valorilor determinate pentru P poate fi testată prin compararea valorilor medii rezultate la determinările duble cu media generală.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identitate și impurități);

— când metodele nu sunt aplicabile (de exemplu, pentru agenții tensioactivi) se prezintă o valoare calculată sau una estimată bazată pe solubilitățile individuale în n-octanol și apă;

— toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cele referitoare la impurități și la starea fizică a substanței.

Pentru metoda agitării flaconului:

— rezultatul estimării preliminare, dacă există;

— temperatura la care s-au făcut determinările;

— date despre metodele analitice folosite pentru determinarea concentrațiilor;

— timpul și viteza de centrifugare, dacă a fost folosită;

▼B

— concentrațiile măsurate în ambele faze pentru fiecare determinare (aceasta înseamnă că se prezintă un total de 12 concentrații);

— masa substanței de testat, volumul fiecărei faze folosite în fiecare vas de testare și cantitatea totală calculată de substanță, prezentă în fiecare fază după atingerea echilibrului;

— valorile calculate ale coeficientului de partiție (P) și media lor se consemnează pentru fiecare set de condiții experimentale, ca și media pentru toate determinările. Dacă există vreun indiciu privind coeficientul de partiție în funcție de concentrație, aceasta este notată în raport;

— se consemnează deviația standard a valorilor individuale ale lui P de la media lor;

— media P a tuturor determinărilor se exprimă și ca logaritm (în baza 10);

— valoarea calculată teoretic pentru P_{ow} când această valoare a fost determinată sau când valoarea măsurată este > 10^4;

— pH-ul apei folosite în timpul experimentului și al fazei apoase;

— dacă sunt folosite soluții tampon, justificarea pentru folosirea soluțiilor tampon în locul apei, compoziția, concentrația și pH-ul soluțiilor tampon, pH-ul fazei apoase, înainte și după experiment.

Pentru metoda HPLC:

— rezultatul estimării preliminare, dacă există;

— substanțele de referință și de testat și puritatea lor;

— intervalul de temperatură al determinărilor;

— pH-ul la care au fost făcute determinările;

— detalii despre coloana analitică și de gardă, faza mobilă și mijlocul de detecție;

— datele privind retenția și valorile log P din literatură pentru compușii de referință folosiți la calibrare;

— detalii despre dreapta de regresie calculată (log k în funcție de log P);

— datele de retenție medii și valoarea interpolată log P pentru compusul de testat;

— descrierea echipamentului și a condițiilor de operare;

— profilurile de eluție;

— cantitățile de substanță de testat și de referință introduse în coloană;

— timpul mort și cum a fost măsurat.

▼B

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

3. Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

4. L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, p. 683.

5. H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, p. 219 (1981).

6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, p. 73.

7. W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, p. 1.

8. J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, p. 675.

9. S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, p. 787.

10. O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, p. 223-339.

11. R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, p. 479.

12. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

13. R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

14. NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical prqducts for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.

15. C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.

16. A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

17. C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 1207.

18. W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, p. 1113.

19. D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, p. 382.

20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

21. R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

22. Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base1,1978.

23. N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, p. 615.

▼B

Apendicele 1

Metode de calcul/estimare

INTRODUCERE

O introducere generală în metodele de calcul, cu date și exemple este furnizată de Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Valorile calculate pentru P_{ow} pot fi folosite:

— pentru a decide care dintre metodele experimentale este adecvată (intervalul pentru metoda agitării flaconului: log P_{ow}: – 2 până la 4, intervalul HPLC: log P_{ow}: 0 până la 6);

— pentru selectarea condițiilor de testare adecvate (de exemplu, substanțe de referință pentru procedurile HPLC, raportul de volume n-octanol/apă pentru metoda agitării flaconului);

— ca verificare internă de laborator a posibilelor erori experimentale;

— pentru a furniza un P_{ow} estimat în cazul când metodele experimentale nu pot fi aplicate din motive tehnice.

METODA ESTIMATIVĂ

Estimarea preliminară a coeficientului de partiție

Valoarea coeficientului de partiție poate fi estimată prin folosirea solubilităților substanței de testat în solvenți puri. Astfel,

$$P_{\text{saturare}} = \frac{\text{saturare } c_{\text{n – octanol}}}{\text{saturare } c_{\text{apă}}}$$

METODE DE CALCUL

Principiul metodelor de calcul

Toate metodele de calcul se bazează pe fragmentarea formală a moleculei în structuri adecvate pentru care se cunosc creșteri fiabile ale valorilor log P_{ow}. Log P_{ow} al întregii molecule este apoi calculat ca sumă a valorilor corespunzătoare fragmentelor plus suma termenilor de corecție pentru interacțiunile intramoleculare.

Listele constantelor fragmentelor și ale termenilor de corecție sunt disponibile în (b), (c), (d) și (e). Unele sunt actualizate cu regularitate (b).

Criterii de calitate

În general, fiabilitatea metodei de calcul scade odată cu creșterea complexității compusului studiat. În cazul moleculelor simple, cu masa moleculară scăzută și una sau două grupe funcționale, se preconizează abateri de la 0,1 până la 0,3 unități log P_{ow} între rezultatele diferitelor metode de fragmentare și valoarea măsurată. În cazul moleculelor mai complexe, marja de eroare poate fi mai mare. Aceasta va depinde de fiabilitatea și disponibilitatea constantelor de fragmente, precum și de abilitatea analistului de a recunoaște interacțiuni intramoleculare (de exemplu legături de hidrogen) și de corecta folosire a factorilor de corecție (o problemă care apare mai puțin dacă se folosește programul CLOGP-3) (b). În cazul compușilor ionizabili este importantă atribuirea corectă a sarcinii sau a gradului de ionizare.

▼B

Metode de calcul

Metoda π a lui Hansch

Constanta substituentului hidrofob original, π, introdusă de Fujita *et al.* (f) se definește ca:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) – $\log P_{ow}$ (PhH)

unde P_{ow} (PhX) este coeficientul de partiție al unui derivat aromatic și P_{ow} (PhH) este coeficientul de partiție al compusului inițial.

[de exemplu $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5Cl) – $\log P_{ow}$ (C_6H_6) = 2,84 – 2,13 = 0,71].

În concordanță cu definiția, metoda π este aplicabilă în special pentru substituenții aromatici, valorile π pentru un mare număr de substituenți fiind tabelate (b) (c) (d). Acestea sunt folosite pentru calcularea log P_{ow} pentru molecule sau substructuri aromatice.

Metoda Rekker

Conform lui Rekker (g), valoarea pentru log P_{ow} se calculează după cum urmează:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j \text{(termeni de interacțiune)}$$

unde f_i reprezintă constantele diferitelor fragmente moleculare și a_i frecvența apariției lor în molecula investigată. Termenii de corecție pot fi exprimați ca un multiplu întreg al unei singure constante C_m (așa numita „constantă magică"). Constantele de fragment f_i și C_m au fost determinate dintr-o listă de 1 054 valori experimentale pentru P_{ow} (825 de compuși), folosind analiza regresivă multiplă (c) (h). Determinarea termenilor de interacțiune este efectuată în concordanță cu regulile stabilite descrise în literatură (e) (h) (i).

Metoda Leo-Hansch

Potrivit lui Leo și Hansch (c), valoarea log P_{ow} se calculează din:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

unde f_i reprezintă constantele diferitelor fragmente moleculare, F_j termenii de corecție, iar a_i, b_j frecvența fragmentului corespunzător. Din valorile experimentale P_{ow}, a fost determinată prin încercare și eroare o listă a valorilor pentru fragmentele atomice și de grup și o listă a termenilor de corecție F_j (așa numiții „factori").Termenii de corecție au fost ordonați în diferite clase (a) (c). A lua în considerare toate regulile și termenii de corecție este relativ complicat și consumă timp. Pentru această metodă există câteva pachete de programe computerizate (b).

Metoda combinată

Calculul log P_{ow} al moleculelor complexe poate fi considerabil îmbunătățit, dacă molecula este împărțită în substructuri mari, pentru care există valori log P_{ow} fiabile fie din tabele (b) (c), fie din măsurătorile proprii. Astfel de fragmente (de exemplu heterocicluri, antrachinona, azobenzen) pot fi apoi combinate cu valorile π Hansch sau cu constantele fragmentelor Rekker sau Leo.

Observații

(i) Metodele de calcul pot fi aplicate compușilor parțial sau total ionizați numai atunci când este posibil să se ia în considerare factorii de corecție necesari.

▼B

(ii) Dacă se presupune că există legături de hidrogen intramoleculare, trebuie adăugați termenii de corecție corespunzători (aproximativ + 0,6 până la + 1,0 unități log P_{ow}) (a). Indicații privind prezența unor astfel de legături pot fi obținute din modelele stereochimice sau din datele spectroscopice ale moleculei.

(iii) Dacă sunt posibile diferite forme tautomere, structura cea mai probabilă va fi folosită ca bază de calcul.

(iv) Edițiile revizuite ale listelor cu constantele fragmentelor se vor urmări atent.

Raport de testare

Când se folosesc metodele de calcul/estimare, raportul de testare cuprinde următoarele informații, dacă este posibil:

— descrierea substanței (amestec, impurități etc.);

— indicarea oricăror posibile legături de hidrogen intramoleculare, a disocierii, a sarcinii și a oricăror altor efecte neobișnuite (de exemplu tautomerie);

— descrierea metodei de calcul;

— identificarea sau anexarea bazei de date folosită;

— particularități în alegerea fragmentelor;

— documentația cuprinzătoare a calculului.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.-Chill. Ther. 1979, vol. 14, p. 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, p. 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Apendicele 2

Substanțele de referință recomandate pentru metoda HPLC

Nr. crt.	Substanță de referință	log P_{ow}	pKa
1	2-butanonă	0,3	
2	4-acetilpiridină	0,5	
3	anilină	0,9	
4	acetanilidă	1,0	
5	alcool benzilic	1,1	
6	p-metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	acid fenoxi acetic	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenilacetonitril	1,6	
12	alcool 4-metilbenzilic	1,6	
13	acetofenonă	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	acid 3-nitrobenzoic	1,8	pKa = 3,47
16	4-cloranilină	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	alcool cinamic	1,9	
19	acid benzoic	1,9	pKa = 4,19
20	p-crezol	1,9	pKa = 10,17
21	acid cinamic	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	benzoat de metil	2,1	
24	benzen	2,1	
25	acid 3- metilbezoic	2,4	pKa = 4,27
26	4-clorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	tricloretilenă	2,4	
28	atrazină	2,6	
29	benzoat de etil	2,6	
30	2,6-diclorbenzonitril	2,6	
31	acid 3-clorbenzoic	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	1- naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dicloranilină	2,8	
35	clorbenzen	2,8	
36	alil-fenileter	2,9	
37	brombenzen	3,0	

▼B

Nr. crt.	Substanță de referință	log P_{ow}	pKa
38	etilbenzen	3,2	
39	benzofenonă	3,2	
40	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	timol	3,3	
42	1,4-diclorbenzen	3,4	
43	difenilamină	3,4	pKa = 0,79
44	naftalină	3,6	
45	fenilbenzoat	3,6	
46	izopropilbenzen	3,7	
47	2,4,6-triclorfenol	3,7	pKa = 6
48	bifenil	4,0	
49	benzilbenzoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sec-butilfenol	4,1	
51	1,2,4-triclorbenzen	4,2	
52	acid dodecanoic	4,2	
53	difenileter	4,2	
54	n- butilbenzen	4,5	
55	fenantren	4,5	
56	fluoranten	4,7	
57	dibenzil	4,8	
58	2,6-difenil-piridină	4,9	
59	trifenilamină	5,7	
60	DDT	6,2	
	Alte substanțe de referință cu log P_{ow} mic		
1	acid nicotinic	- 0,07	

▼B

A.9. PUNCTUL DE INFLAMABILITATE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Pentru efectuarea acestui test, este util să se colecteze informații preliminare despre inflamabilitatea substanței. Modul de operare este aplicabil substanțelor lichide ai căror vapori se pot aprinde în prezența unei surse de aprindere. Metodele de testare prezentate în acest text sunt fiabile numai pentru intervalele de puncte de inflamabilitate specificate pentru fiecare metodă în parte.

La alegerea metodei ce urmează să fie folosită se va lua în considerare posibilitatea apariției unor reacții chimice între substanță și suportul probei.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Punctul de inflamabilitate este cea mai joasă temperatură, corectată la presiunea de 101,325 kPa, la care lichidul degajă vapori, în condițiile specifice ale metodei de analiză, într-o asemenea cantitate încât în vasul de testare se produce un amestec inflamabil vapori/aer.

Unități: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t în ^{o}C și T în K)

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o nouă substanță. Acestea trebuie în special să servească la etalonarea periodică a metodei și la comparația cu rezultatele obținute prin alte metode

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Substanța se introduce în vasul de testare și este încălzită sau răcită până la temperatura de testare conform procedurii specifice metodei de testare. Încercările de aprindere sunt efectuate pentru a dovedi dacă eșantionul se aprinde sau nu la temperatura de testare.

1.5. CRITERII DE CALITATE

1.5.1. **Repetabilitate**

Repetabilitatea variază în funcție de intervalul punctului de inflamabilitate și de metoda folosită; maximum 2 ^{o}C.

1.5.2. **Sensibilitate**

Sensibilitatea depinde de metoda de testare folosită.

1.5.3. **Specificitate**

Specificitatea unora dintre metode este limitată la anumite intervale de puncte de inflamabilitate și depinde de caracteristicile substanței (de exemplu, viscozitate mare).

▼B

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Pregătiri**

O probă de substanță se introduce într-un aparat de testare în conformitate cu punctul 1.6.3.1 și/sau 1.6.3.2.

Pentru siguranță se recomandă ca pentru substanțele reactive sau toxice să fie folosită o metodă care utilizează o cantitate mică de probă, circa 2 cm^3.

1.6.2. **Condiții experimentale**

Aparatul se așează într-o poziție fără curenți de aer, în conformitate cu normele de siguranță.

1.6.3. **Desfășurarea testului**

1.6.3.1. *Metoda echilibrului*

A se vedea ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Metoda non-echilibrului*

Aparatul Abel:

A se vedea BS 2000 partea 170, NF M07-011, NF T66-009.

Aparatul Abel-Pensky:

A se vedea EN 57, DIN 51755 partea 1 (pentru temperaturi de la 5° la 65 °C), DIN 51755 partea 2 (pentru temperaturi sub 5 °C), NF M07-036.

Aparatul Tag:

A se vedea ASTM D 56.

Aparatul Pensky-Martens:

A se vedea ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Observații:

Când punctul de inflamabilitate, determinat printr-o metodă de non-echilibru în conformitate cu punctul 1.6.3.2, are valori de 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C sau 55 ± 2 °C, acest lucru se confirmă printr-o metodă de echilibru, folosindu-se același aparat.

Numai metodele prin care se poate determina temperatura de inflamabilitate pot fi folosite pentru notificări.

Pentru a determina punctul de inflamabilitate al lichidelor vâscoase (vopsele, rășini și altele similare) care conțin solvenți, pot fi folosite numai aparate și metode potrivite pentru determinarea punctului de inflamabilitate al lichidelor vâscoase.

A se vedea ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 partea 1.

▼B

2. **DATE**

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— o descriere a metodei folosite, precum și orice posibile abateri;

— rezultatele și orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Niciuna.

▼B

A.10. **INFLAMABILITATE (SOLIDE)**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Înainte de efectuarea testului este util să se colecteze informații preliminare asupra posibilelor proprietăți explozive ale substanței.

Acest test se aplică numai substanțelor sub formă de pulbere, granule sau pastă.

Pentru a nu include toate substanțele care se pot aprinde, ci numai acelea care ard rapid sau acelea al căror comportament la ardere este periculos în orice mod, se consideră că sunt foarte inflamabile numai substanțele a căror viteză de ardere depășește o anumită valoare-limită.

Poate fi deosebit de periculos dacă incandescența se propagă printr-o pulbere metalică din cauza dificultăților în stingerea focului. Pulberile metalice vor fi considerate foarte inflamabile dacă întreține propagarea incandescenței în toată masa într-un interval de timp definit.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Timpul de ardere este exprimat în secunde.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt menționate.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Substanța este dispusă sub forma unei benzi continue sau a unui amestec de pulbere explozivă de aproximativ 250 mm lungime și este efectuat un test preliminar pentru a stabili dacă are loc, prin aprindere cu o flacără de gaz, propagarea prin ardere cu flacără sau mocnit. Dacă propagarea de-a lungul a 200 mm de amestec are loc într-un interval de timp specificat, atunci se efectuează un program complet de testare pentru a determina viteza de ardere.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu sunt menționate.

▼B

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Testul preliminar**

Substanța este dispusă sub forma unui cartuș compact sau a unui amestec de pulbere explozivă de aproximativ 250 mm lungime, 20 mm lățime, 10 mm înălțime, pe o placă de bază necombustibilă, neporoasă și care nu conduce bine căldura. O flacără de la un arzător cu gaz (minimum 5 mm diametru) este aplicată la unul din capetele amestecului de pulbere explozivă până când pulberea se aprinde sau timp de maximum 2 minute (5 minute pentru pulberi metalice sau de aliaje metalice). Se observă dacă de-a lungul celor 200 mm de amestec combustia se propagă în perioada de testare de 4 minute (sau 40 de minute pentru pulberile de metal). Dacă substanța nu se aprinde și combustia nu se propagă, nici prin ardere cu flacără, nici prin ardere mocnită, de-a lungul celor 200 mm de amestec de pulbere explozivă în perioada de testare de 4 minute (sau 40 minute), atunci substanța nu este considerată foarte inflamabilă și nu este necesară o altă testare. Dacă substanța propagă arderea de-a lungul a 200 mm lungime de amestec de pulbere explozivă în mai puțin de 4 minute, sau mai puțin de 40 de minute pentru pulberile metalice, atunci se urmează metoda descrisă mai jos (punctul 1.6.2 și următoarele).

1.6.2. **Testarea vitezei de ardere**

1.6.2.1. *Pregătire*

Substanțele granulare sau pulberile sunt introduse lejer într-o matriță de 250 mm lungime cu secțiune transversală triunghiulară cu înălțime interioară de 10 mm și lățime de 20 mm. Pe ambele fețe ale matriței, pe direcție longitudinală, se montează două plăci metalice ca opritoare laterale care depășesc cu 2 mm extremitatea superioară a secțiunii transversale triunghiulare (figura). Apoi se lasă matrița să cadă de trei ori de la o înălțime de 2 cm pe o suprafață solidă. Dacă este necesar, forma este apoi umplută din nou. Substanța în exces care rămâne se curăță cu o racletă oblică. Plăcile opritoare se scot și substanța rămasă este îndepărtată cu o racletă. Se pune deasupra matriței o placă de bază necombustibilă, neporoasă și slab conducătoare de căldură, ansamblul este răsturnat și se scoate forma.

Substanțele sub formă de pastă sunt întinse pe o placă necombustibilă, neporoasă și slab conducătoare de căldură sub forma unei fâșii de 250 mm lungime cu o secțiune transversală de aproximativ 1 cm.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

În cazul substanțelor sensibile la umezeală, testul va fi efectuat cât mai repede posibil după scoaterea din recipient.

1.6.2.3. *Desfășurarea testului*

Se pune eșantionul perpendicular pe curentul de aer din nișa de tiraj.

Viteza aerului trebuie să fie suficientă pentru a preveni degajarea vaporilor în laborator și să nu varieze în timpul testului. Curentul de aer trebuie să formeze un ecran în jurul aparatului.

O flacără fierbinte de la un arzător cu gaz (minimum 5 mm diametru) este folosită pentru a aprinde substanța în formă de cartuș, la o margine. Când cartușul a ars pe o distanță de 80 mm se măsoară viteza de ardere de-a lungul următorilor 100 de mm.

▼B

Testul se efectuează de 6 ori, folosind de fiecare dată o placă rece, curată, afară de cazul când este observat mai devreme un rezultat pozitiv.

2. **DATE**

Timpul de ardere din testul preliminar (1.6.1) și cel mai scurt timp de ardere din cele 6 teste (1.6.2.3) sunt relevante pentru evaluare.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— o descriere a substanței de testat, starea sa fizică, inclusiv conținutul de umezeală;

— rezultatele testului preliminar de triere și ale testului vitezei de ardere, dacă au fost efectuate;

— toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Substanțele sub formă de pulbere, pastă sau granulare se consideră foarte inflamabile dacă timpul de ardere dintr-unul din testele efectuate conform metodei de testare descrise la 1.6.2. este mai mic de 45 de secunde. Pulberile metalice sau de aliaje metalice sunt considerate foarte inflamabile dacă pot fi aprinse și flacăra sau zona de reacție se întinde asupra întregului eșantion în 10 minute sau mai puțin.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

NF T 20-042 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

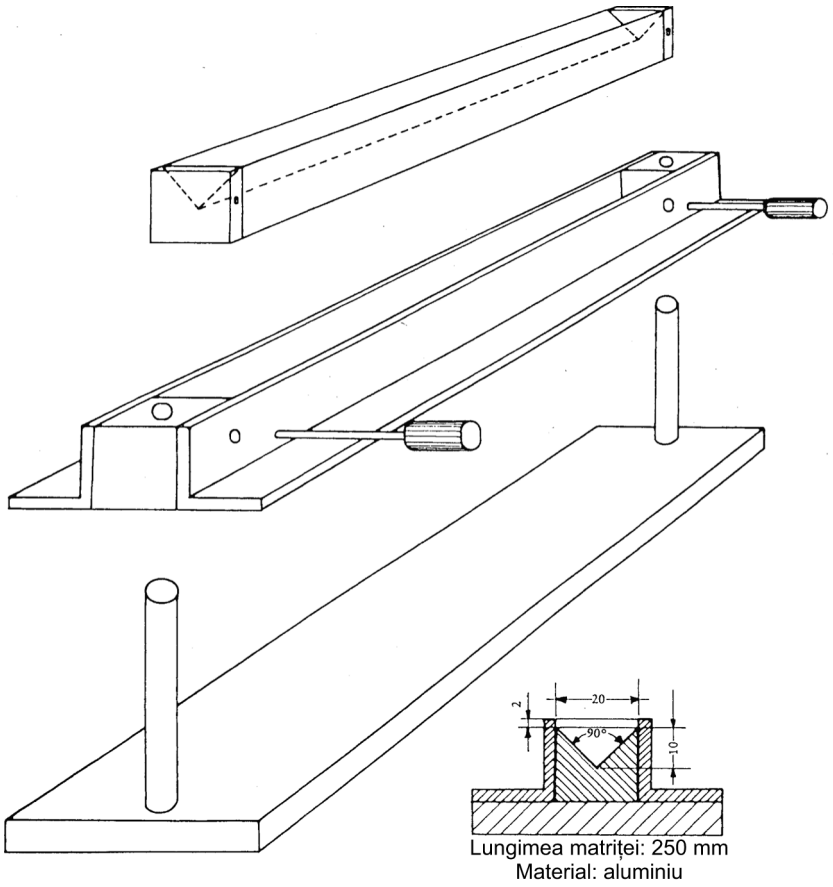
▼B

Apendice

Figură

Matrița și accesoriile pentru eșantionul în formă de cartuș

(Toate dimensiunile în milimetri)



▼B

A.11. INFLAMABILITATE (GAZE)

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Prin această metodă se determină dacă amestecurile de gaze cu aer, la temperatura camerei (circa 20 °C) și presiune atmosferică, sunt inflamabile și, în acest caz, în ce interval de concentrații. Amestecurile cu aer ale gazului testat, în concentrații crescânde, sunt expuse unei scântei electrice și se observă dacă are loc aprinderea.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Intervalul de inflamabilitate este intervalul de concentrație dintre limita de explozie inferioară și cea superioară. Limitele de explozie inferioară și superioară sunt acele limite de concentrație ale gazului inflamabil în aer la care propagarea flăcării nu are loc.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt menționate.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Concentrația gazului în aer se crește treptat și în fiecare etapă amestecul se expune la scânteie electrică.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu sunt menționate.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Aparatură**

Vasul de testare este un cilindru de sticlă vertical cu un diametru interior de minimum 50 mm și o înălțime de minimum 300 de mm. Electrozii de aprindere sunt separați de o distanță de 3 până la 5 mm și sunt plasați la 60 mm deasupra fundului cilindrului. Cilindrul este prevăzut cu o supapă de descărcare a presiunii. Aparatul trebuie să fie protejat pentru a limita posibilele efecte ale exploziei.

Ca sursă de aprindere este folosită o scânteie cu o durată de 0,5 secunde, generată de un transformator de înaltă tensiune cu o tensiune de ieșire de 10-15 kV (maximum de putere consumată 300 W). Un exemplu de aparat adecvat este descris în referința bibliografică 2.

1.6.2. **Condiții experimentale**

Testul trebuie efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C).

▼B

1.6.3. **Desfășurarea testului**

Folosind o pompă dozatoare, un amestec cu concentrație cunoscută de gaz în aer este introdus în cilindrul de sticlă. Prin amestec se trece o scânteie și se observă dacă flacăra se detașează de sursa de aprindere și se propagă independent. Concentrația gazului este mărită în pași de 1 % din volum până când are loc aprinderea conform descrierii de mai sus.

Dacă structura chimică a gazului indică faptul că acesta nu este inflamabil și poate fi calculată compoziția amestecului stoechiometric cu aerul, atunci este necesar să se testeze numai amestecuri din intervalul de la 10 % sub concentrația stoechiometrică până la 10 % peste această concentrație, în pași de 1 %.

2. **DATE**

Propagarea flăcării este singura informație relevantă pentru determinarea acestei proprietăți.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— o descriere, cu dimensiuni, a aparatului utilizat;

— temperatura la care a fost efectuat testul;

— concentrațiile testate și rezultatele obținute;

— rezultatul testului: gaz neinflamabil sau gaz foarte inflamabil;

— dacă se ajunge la concluzia că gazul nu este inflamabil, se va specifica intervalul de concentrație în care a fost testat în pași de 1 %;

— toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor trebuie raportate.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. NF T 20-041 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.- Tech. 1984, vol, 156, 2, p. 126-127. Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. 'Entwicklung

▼B

A.12. INFLAMABILITATE (CONTACTUL CU APA)

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Metoda poate fi folosită pentru a stabili dacă reacția substanței cu apa sau cu umezeala din aer conduce la degajarea unor cantități periculoase de gaz sau gaze foarte inflamabile.

Metoda poate fi aplicată atât substanțelor solide, cât și celor lichide. Această metodă nu este aplicabilă substanțelor care se aprind în mod spontan în contact cu aerul.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Foarte inflamabil: o substanță care în contact cu apa sau aerul umed degajă gaze foarte inflamabile în cantități periculoase la un debit minim de 1 litru/kg pe oră.

1.3. PRINCIPUL METODEI

Substanța este testată în concordanță cu succesiunea de pași descrisă mai jos; dacă are loc aprinderea la unul din pași, nu mai este necesară testarea în continuare. Dacă se știe că substanța nu reacționează violent cu apa atunci se va trece direct la pasul 4 (punctul 1.3.4).

1.3.1. **Pasul 1**

Proba se introduce într-un jgheab care conține apă distilată la 20 ^{o}C și se notează dacă gazul dezvoltat se aprinde.

1.3.2. **Pasul 2**

Substanța este plastă pe o hârtie de filtru care plutește la suprafața apei distilate dintr-o capsulă de laborator, la 20 ^{o}C, și se observă dacă gazul dezvoltat se aprinde. Hârtia de filtru are rolul numai de a ține substanța într-un loc, pentru a crește șansa de aprindere.

1.3.3. **Pasul 3**

Eșantionul este prelucrat sub forma unui cartuș de aproximativ 2 cm înălțime și 3 cm diametru. Se adaugă câteva picături de apă și se notează dacă gazul dezvoltat se aprinde.

1.3.4. **Pasul 4**

Eșantionul este amestecat cu apă distilată la 20 ^{o}C și este măsurată viteza de degajare a gazului în timpul unei perioade de 7 ore, la intervale de 1 oră. Dacă viteza de degajare este inegală, sau este crescătoare, după 7 ore, timpul de măsurare poate fi extins la un timp maxim de 5 zile. Testul poate fi oprit dacă viteza la un moment dat depășește 1 l/kg/h.

▼B

1.4. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt menționate.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu sunt menționate.

1.6. DESCRIEREA METODELOR

1.6.1. **Pasul 1**

1.6.1.1. *Condiții experimentale*

Testul este efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.1.2. *Desfășurarea testului*

O cantitate mică (aproximativ 2 mm diametru) din eșantion se introduce într-un jgheab cu apă distilată. Se notează dacă (i) se dezvoltă vreun gaz și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

1.6.2. **Pasul 2**

1.6.2.1. *Aparatură*

O hârtie de filtru este făcută să plutească pe suprafața plană de apă distilată într-un vas potrivit, de exemplu o sticlă de ceas cu 100 mm diametru.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

Testul se efectuează la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.2.3. *Desfășurarea testului*

O cantitate mică (aproximativ 2 mm diametru) din eșantion se introduce în centrul unei hârtii de filtru. Se va nota dacă (i) apar gaze și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

1.6.3. **Pasul 3**

1.6.3.1. *Condițiile experimentale*

Testul se efectuează la temperatura camerei (circa 20 °C).

1.6.3.2. *Desfășurarea testului*

Eșantionul este prelucrat sub forma unui cartuș de aproximativ 2 cm înălțime și 3 cm diametru și cu o scobitură la vârf. Câteva picături de apă sunt adăugate în scobitură și se notează dacă (i) apar gaze și (ii) dacă are loc aprinderea gazului. Dacă are loc aprinderea gazului, nu mai este necesară testarea în continuare a substanței deoarece substanța este considerată periculoasă.

▼B

1.6.4. **Pasul 4**

1.6.4.1. *Aparatură*

Instalația este descrisă în figură.

1.6.4.2. *Condițiile experimentale*

Se examinează containerul cu eșantion pentru a observa dacă există pulberi < 500 μm (dimensiunea particulei). Dacă pulberea reprezintă mai mult de 1 % g/g din total sau dacă eșantionul este friabil, atunci toată substanța va fi mojarată până la pulbere înainte de testare pentru a permite reducerea dimensiunilor particulelor în timpul depozitării și manipulării; în caz contrar, substanța va fi testată așa cum a fost primită. Testul va fi efectuat la temperatura camerei (circa 20 °C) și la presiune atmosferică.

1.6.4.3. *Desfășurarea testului*

10-20 ml de apă se pun în pâlnia de picurare a aparatului și 10 grame din substanță se introduc în paharul conic. Volumul de gaz degajat poate fi măsurat prin orice mijloc corespunzător. Se deschide robinetul pâlniei de picurare pentru a lăsa apa să treacă în paharul conic și se pornește cronometrul. Degajarea gazului este măsurată la intervale de o oră de-a lungul unei perioade de 7 ore. Dacă în timpul acestei perioade degajarea gazului este inegală sau dacă la sfârșitul acestei perioade viteza de degajare a gazului este în creștere, atunci măsurătorile vor fi continuate timp de cel mult 5 zile. Dacă la un moment dat în timpul măsurărilor viteza de degajare a gazului depășește 1 l/kg/oră, testul poate fi întrerupt. Testul se efectuează de 3 ori.

Dacă identitatea chimică a gazului este necunoscută, gazul se analizează. Atunci când gazul conține componenți foarte inflamabili și nu se cunoaște dacă amestecul este foarte inflamabil, trebuie preparat un amestec cu aceeași compoziție și testat conform metodei A.11.

2. **DATE**

Substanța este considerată periculoasă dacă:

— are loc o aprindere spontană în oricare din etapele metodei de testare;

sau

— există o degajare de gaz inflamabil cu o viteză mai mare de 1 l/kg de substanță pe oră.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— detalii despre prepararea inițială a substanței;

▼B

— rezultatele testelor (pașii 1, 2, 3 și 4);

— identitatea chimică a gazului degajat;

— viteza de degajare a gazului, dacă s-a efectuat pasul 4 (punctul 1.6.4);

— orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

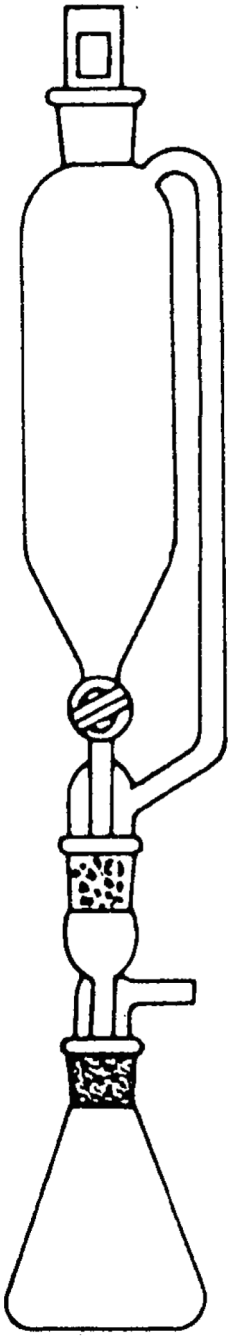
2. NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Apendice

Figura

Aparat



▼B

A.13. PROPRIETĂȚI PIROFORICE ALE SOLIDELOR ȘI ALE LICHIDELOR

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Procedura este aplicabilă substanțelor solide sau lichide care, în cantități mici, se aprind spontan la scurt timp după ce intră în contact cu aerul la temperatura camerei (circa 20 °C).

Această metodă de testare nu reglementează substanțele care necesită expunere la aer ore sau zile la temperatura camerei sau cele la care se produce aprinderea la temperaturi ridicate.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Substanțele sunt considerate ca având proprietăți piroforice dacă se aprind sau se carbonizează în condițiile descrise la punctul 1.6.

Autoaprinderea lichidelor poate fi, de asemenea, testată folosind metoda A.15 Temperatura de autoaprindere (lichide și gaze).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt menționate.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Substanța, solidă sau lichidă, este depusă pe un suport inert și adusă în contact cu aerul la temperatura ambiantă timp de 5 minute. Dacă substanțele lichide nu se aprind, sunt absorbite pe o hârtie de filtru și expuse la aer la temperatura ambiantă (circa 20 °C) pentru 5 minute. Dacă o substanță lichidă ori solidă se aprinde sau dacă o substanță lichidă aprinde sau carbonizează hârtia de filtru, atunci acea substanță este considerată a fi piroforică.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Repetabilitatea: din motive de siguranță, un singur rezultat pozitiv este suficient pentru ca substanța să fie considerată piroforică.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Aparatură**

O capsulă de porțelan de cca. 10 cm diametru se umple cu pământ de diatomee până la o înălțime de aproximativ 5 mm, la temperatura camerei (circa 20 °C).

Notă:

Pământul de diatomee sau o altă substanță inertă comparabilă care este disponibilă în mod uzual este considerat ca reprezentativ pentru solul pe care proba poate fi răsturnată în caz de accident.

Pentru testarea lichidelor care nu se aprind în contact cu aerul este necesară o hârtie de filtru uscată atunci când intră în contact cu un agent purtător inert.

▼B

1.6.2. **Desfășurarea testului**

(a) *Solide sub formă de pulbere*

Se toarnă 1-2 cm^3 de pulbere de substanță de la circa 1 m înălțime pe o suprafață necombustibilă și se observă dacă substanța se aprinde în timpul turnării sau în 5 minute de la depunere.

Testul este efectuat de 6 ori dacă nu are loc aprinderea.

(b) *Lichide*

Se toarnă aproximativ circa 5 cm^3 de lichid într-o capsulă de porțelan și se observă dacă substanța se aprinde în interval de 5 minute.

Dacă nu are loc nicio aprindere în 6 testări, se vor efectua următoarele teste:

Un eșantion de 0,5 ml este împins dintr-o seringă pe o hârtie de filtru pliată și se observă dacă are loc aprinderea sau carbonizarea hârtiei de filtru în 5 minute de la adăugarea lichidului. Testul este efectuat de 3 ori dacă nu are loc aprinderea sau carbonizarea.

2. **DATE**

2.1. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Testarea poate fi întreruptă atunci când apare un rezultat pozitiv într-unul din teste.

2.2. EVALUARE

Dacă substanța se aprinde în 5 minute de la adăugarea ei la un purtător inert și expunerea la aer sau o substanță lichidă carbonizează sau aprinde o hârtie de filtru în 5 minute de când a fost adăugată și expusă la aer, este considerată a fi piroforică.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile exacte ale substanței (identificare și impurități);

— rezultatele testelor;

— orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. NF T 20-039 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

2. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. PROPRIETĂȚI EXPLOZIVE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Prezenta metodă permite determinarea probabilității ca o substanță solidă sau sub formă de pastă să prezinte pericol de explozie atunci când este supusă la efectul unei flăcări (sensibilitate termică), la șoc mecanic sau la frecare (sensibilitate la stimuli mecanici) sau ca o substanță lichidă să prezinte pericol de explozie atunci când este supusă la efectul unei flăcări sau la șoc.

Metoda cuprinde trei părți:

(a) un test de sensibilitate termică (1);

(b) un test de sensibilitate mecanică la șoc (1);

(c) un test de sensibilitate mecanică la frecare (1).

Metoda oferă date care permit evaluarea probabilității de a amorsa o explozie cu ajutorul unor stimuli obișnuiți. Scopul ei nu este să determine dacă o substanță sau un preparat este sau nu este susceptibil de a exploda în orice condiții.

Metoda este în măsură să determine dacă o substanță sau un preparat va prezenta pericol de explozie (sensibilitate termică sau mecanică) în condițiile speciale definite în directivă. Metoda se bazează pe mai multe tipuri de aparate, folosite pe scară largă pe plan internațional (1) și care au, în general, rezultate edificatoare. Se admite totuși că metoda nu este definitivă. Se pot folosi aparate alternative, cu condiția ca acestea să fie recunoscute pe plan internațional și ca rezultatele să poată fi corelate în mod adecvat cu cele obținute pe aparatul specificat.

Testele nu se justifică dacă datele termodinamice disponibile (căldura de formare, căldura de descompunere) și absența anumitor grupe reactive (2) în formula structurală permit să se stabilească în mod cert că substanța sau preparatul nu este susceptibil de a se descompune rapid cu degajare de gaze sau de căldură (altfel spus, materialul nu prezintă riscuri de explozie). Pentru lichide nu este necesar testul de sensibilitate mecanică la frecare.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Exploziv:

Substanțe care sunt susceptibile de a exploda sub efectul flăcării sau sunt sensibile la șoc ori frecare în aparatul specificat (sau sunt mai sensibile din punct de vedere mecanic decât 1,3-dinitrobenzenul într-un aparat alternativ).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

1,3-dinitrobenzen, în stare cristalină, de puritate tehnică, cernut să treacă prin sita cu ochiuri de 0,5 mm, pentru metodele de testare prin frecare și prin șoc.

Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX, hexogen, ciclonit – CAS 121-82-4), recristalizată din soluție apoasă de ciclohexanonă, cernută în stare umedă prin sită cu ochiuri de 250 μm și reținută pe sită cu ochiuri de 150 μm și apoi uscată la 103 ± 2 °C (timp de 4 ore) pentru o a doua serie de teste de sensibilitate mecanică (la șoc și frecare).

▼B

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Sunt necesare teste preliminare pentru a determina condițiile de siguranță în care se desfășoară cele trei teste de sensibilitate.

1.4.1. **Teste pentru determinarea siguranței în manipulare (3)**

Din motive de siguranță, înainte de realizarea testelor principale, se supun eșantioane foarte mici (cca. 10 mg.) de substanță la încălzire în aer liber cu flacără de arzător cu gaz, la șoc, în orice formă adecvată de aparat, și la frecare, folosind un ciocan de lemn și o nicovală, sau orice alt dispozitiv de frecare. Obiectivul constă în a determina dacă substanța este suficient de sensibilă și explozibilă încât realizarea testelor de sensibilitate prescrise, în special cel de sensibilitate termică, să necesite precauții speciale pentru a evita vătămarea operatorului.

1.4.2. **Sensibilitatea termică**

Metoda constă în încălzirea substanței într-un tub din oțel, închis cu plăci cu orificii de diametre diferite, pentru a determina dacă substanța este susceptibilă de a exploda în condiții de încălzire intensă și spațiu limitat într-un mod definit.

1.4.3. **Sensibilitatea mecanică (la șoc)**

Metoda constă în supunerea substanței la șocul produs de un corp cu masă specificată care cade de la o înălțime specificată.

1.4.4. **Sensibilitatea mecanică (la frecare)**

Metoda constă în supunerea unei substanțe, aflată în stare solidă sau sub formă de pastă, la frecare între suprafețe standardizate, în condiții specificate de forță și deplasare relativă.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu sunt menționate.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Sensibilitatea termică (efectul flăcării)**

1.6.1.1. *Aparatură*

Aparatura este constituită dintr-un tub din oțel, de unică folosință, cu dispozitive de închidere refolosibile (figura 1), instalat într-un dispozitiv de încălzire și protecție. Fiecare tub este obținut prin ambutisarea adâncă a tablei de oțel (a se vedea apendicele) și are un diametru interior de 24 mm, o lungime de 75 mm și o grosime a pereților de 0,5 mm. Tuburile sunt prevăzute cu flanșă la extremitatea deschisă, pentru a permite închiderea fiecăruia cu setul plăcii cu orificii. Acesta este constituit dintr-o placă cu rezistență la presiune, cu un orificiu central, montată strâns pe tub printr-o îmbinare cu șurub din două părți (piuliță și o șaibă filetată). Piulița și șaiba filetată sunt realizate din oțel crom-mangan (a se vedea apendicele) care nu produce scântei până la 800 ^{o}C. Plăcile perforate au o grosime de 6 mm, sunt realizate din oțel termorezistent (a se vedea apendicele) și sunt disponibile într-o gamă de diametre și orificii.

▼B

1.6.1.2. *Condiții experimentale*

În general, substanța este supusă testului în forma în care este primită, deși în anumite cazuri, de exemplu dacă este presată, turnată sau condensată într-un mod anume, s-ar putea să fie necesară mărunțirea acesteia înaintea testului.

Pentru substanțele solide, masa materialului ce urmează să fie supus testelor se determină printr-o metodă, în două etape, a probei în gol. Un tub căruia i s-a determinat tara este umplut cu 9 cm^3 de substanță și aceasta este tasată cu o forță de 80 N aplicată pe toată secțiunea transversală a tubului. Din motive de siguranță sau în cazurile în care este posibilă modificarea formei fizice a eșantionului prin compresie, se pot folosi alte procedee de umplere; de exemplu, dacă substanța este foarte sensibilă la frecare, nu se recomandă tasarea. Dacă substanța se poate comprima, atunci se mai adaugă și se tasează până la umplerea tubului pe o lungime de 55 mm de la capăt. Se determină masa totală a substanței folosite la umplerea tubului până la 55 mm și se mai adaugă substanță în două reprize, tasându-se de fiecare dată cu o forță de 80 N. Apoi se mai adaugă și se tasează sau se scoate material, astfel încât tubul să fie umplut pe o lungime de 15 mm de la partea superioară. Se execută a doua operație preliminară a probei în gol, plecând de la o cantitate tasată egală cu o treime din masa totală rezultată în prima etapă a probei gol. Se mai adaugă substanță în două reprize și se tasează cu o forță de 80 N reglându-se nivelul substanței din tub până la 15 mm de la partea superioară prin adăugare sau scoatere de substanță, după caz. Cantitatea de substanță solidă determinată în a doua operație preliminară se utilizează pentru fiecare test; umplerea fiind realizată în trei reprize, cu cantități egale, fiecare comprimată până la 9 cm^3 cu forța necesară, oricare ar fi valoarea acesteia. (Această operație poate fi facilitată prin folosirea unor inele de distanțare.)

Lichidele și gelurile se încarcă în tub până la o înălțime de 60 mm, având grijă în mod deosebit să se evite formarea bulelor în gel. Șaiba filetată este glisată pe tub dinspre bază, se inserează placa perforată corespunzătoare și se strânge piulița după aplicare unui lubrifiant pe bază de disulfură de molibden. Este esențial să se verifice dacă nu a rămas substanță prinsă între flanșă și placă sau în filet.

Încălzirea se realizează cu propan dintr-o butelie industrială, prevăzută cu un regulator de presiune (60-70 mbar), care trece printr-un contor de gaze și este distribuit uniform (în funcție de flacăra arzătoarelor) dintr-un rezervor către patru arzătoare. Arzătoarele sunt distribuite în jurul incintei de testare, așa cum se arată în figura 1. Cele patru arzătoare au un consum combinat de aproximativ 3,2 litri de propan pe minut. Se pot utiliza și alte gaze, respectiv arzătoare, dar viteza de încălzire trebui să fie cea menționată în figura 3. Pentru toate aparatele, viteza de încălzire trebuie să se verifice periodic cu ajutorul tuburilor umplute cu dibutilftalat, după cum se indică în figura 3.

1.6.1.3. *Desfășurarea testelor*

Fiecare test se realizează până la fragmentarea tubului sau după încălzirea tubului timp de cinci minute. Dacă la test se produce fragmentarea tubului în trei sau mai multe bucăți, care uneori pot să fie legate între ele prin fâșii înguste de metal ca în figura 2, se estimează că s-a produs o explozie. Dacă la test rezultă mai puține fragmente sau nu are loc fragmentarea, se consideră că nu s-a produs explozie.

▼B

Se realizează mai întâi o serie de trei teste cu o placă perforată, cu orificiul cu diametrul de 6,0 mm și, dacă nu rezultă nicio explozie, se realizează o a doua serie de trei teste cu o placă cu orificiul de 2,0 mm. Dacă în oricare din seria de teste se produce explozia, nu mai este necesară continuarea testelor.

1.6.1.4. *Evaluare*

Rezultatul testului se consideră ca fiind pozitiv, dacă se produce explozie în oricare din seria de teste menționate anterior.

1.6.2. **Sensibilitatea mecanică (la șoc)**

1.6.2.1. *Aparatura (figura 4)*

Piesele esențiale ale unei sonete clasice cu berbec sunt un bloc de oțel turnat cu soclu, nicovală, coloană, ghidaje, greutăți de șoc, dispozitiv de decuplare și suport pentru probă. Nicovala din oțel cu diametru de 100 mm și înălțimea de 70 mm este prinsă în șuruburi la partea superioară a unui bloc din oțel de 230 mm (lungime) × 250 mm (lățime) × 200 mm (înălțime) cu un soclu turnat de 450 mm (lungime) × 450 (lățime) × 60 mm (înălțime). O coloană, realizată dintr-un tub de oțel trefilat fără sudură, este prinsă într-un suport fixat cu șuruburi pe spatele blocului din oțel. Aparatul este fixat cu patru șuruburi pe un bloc din beton de 60 × 60 × 60 cm, astfel încât șinele de ghidare să fie perfect verticale și greutatea de șoc să cadă liber. Sunt disponibile greutăți de 5-10 kg, realizate din oțel calmat. Berbecul este din oțel călit, HRC 60-63, cu un diametru de minimum 25 mm.

Proba supusă testului este închisă într-un dispozitiv de șoc constituit din doi cilindri coaxiali din oțel calmat, unul deasupra celuilalt, situați într-un cilindru gol de oțel, care se folosește ca inel de ghidare. Cilindrii din oțel calmat au diametrul de 10 (- 0,003, - 0,005) mm și înălțimea de 10 mm, cu fețele lustruite, muchiile rotunjite (raza de curbură de 0,5 mm) și o duritate HRC de 58-65. Cilindrul gol trebuie să aibă un diametru exterior de 16 mm, un alezaj șlefuit de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm și o înălțime de 13 mm. Dispozitivul de șoc este asamblat pe o nicovală intermediară (diametrul 26 mm și înălțimea de 26 mm) realizată din oțel și centrată cu ajutorul unui inel de centrare cu perforații pentru a permite evacuarea vaporilor.

1.6.2.2. *Condiții experimentale*

Volumul eșantionului este de 40 mm^3 sau un volum corespunzător aparatului utilizat. Substanțele solide se supun testului în stare uscată și se pregătesc după cum urmează:

(a) substanțele sub formă de pulberi se cern (ochiul sitei de 0,5 mm); tot materialul care a trecut prin sită se supune testului;

(b) substanțele presate, turnate sau condensate se fărâmițează și se cern; la teste se folosește fracția dintre sita cu ochiuri de 0,5 mm și sita cu ochiuri de 1 mm, care ar trebui să fie reprezentativă.

Substanțele care se livrează în general sub formă de pastă ar trebui să fie supuse testului în stare uscată, dacă este posibil, sau, în orice caz, după eliminarea cantității maxime posibile de diluant. Pentru testarea substanțelor lichide, aparatul de testare se reglează, astfel încât între cilindrii de oțel superior și inferior să existe un spațiu de 1 mm.

▼B

1.6.2.3. *Desfășurarea testelor*

Se realizează o serie de șase teste cu o greutate de șoc de 10 kg în cădere de la 0,40 m (40 J). Dacă se obține o explozie în primele șase teste la 40 J, trebuie să se mai realizeze un set de șase teste, cu greutatea de 5 kg în cădere de la 0,15 m (7,5 J). În alt aparat, proba se compară cu substanța de referință aleasă printr-o metodă stabilită (de exemplu metoda „up-and-down” etc.).

1.6.2.4. *Evaluare*

Rezultatul se consideră pozitiv dacă se produce o explozie (izbucnirea unei flăcări și/sau un zgomot caracteristic unei explozii) cel puțin o dată în oricare din testele cu aparatul specificat sau dacă proba este mai sensibilă decât 1,3-dinitrobenzenul sau RDX într-un test alternativ de sensibilitate la șoc.

1.6.3. **Sensibilitatea mecanică (la frecare)**

1.6.3.1. *Aparatură (figura 5)*

Aparatul pentru testul de sensibilitate la frecare este constituit dintr-o placă de bază din fontă pe care se montează aparatul de testare la frecare. Acesta conține un bulon din porțelan și un disc mobil din porțelan. Discul din porțelan este fixat într-un culisou care se deplasează pe două ghidaje. Culisoul este cuplat la un motor electric prin intermediul unei biele, a unui excentric și unui angrenaj de transmisie corespunzător, astfel încât să se asigure o deplasare a discului de porțelan, doar o singură dată, înainte și înapoi, pe o distanță de 10 mm, sub bulonul din porțelan. Bulonul poate să fie supus unei sarcini, de exemplu, de 120 sau 360 newtoni.

Discurile din porțelan sunt realizate din porțelan tehnic (rugozitatea de 9-32 μm) și au dimensiuni de 25 mm (lungime) × 25 mm (lățimea) × 5 mm (înălțimea). Bulonul cilindric din porțelan se realizează, de asemenea, din porțelan tehnic și are o lungime de 15 mm, diametru de 10 mm și extremitățile rotunjite, cu suprafața rugoasă și cu o rază de curbură de 10 mm.

1.6.3.2. *Condiții experimentale*

Volumul probei este de 10 mm^3 sau un volum corespunzător aparatului utilizat.

Substanțele solide se supun testului în stare uscată și se pregătesc după cum urmează:

(a) substanțele sub formă de pulberi se cern (sită cu ochiuri de 0,5 mm); tot materialul care a trecut prin sită se supune testului;

(b) substanțele presate, formate în matriță sau condensate se fărâmițează și se cern; la teste se utilizează fracțiunea care a trecut prin site cu ochiuri < 0,5 mm.

Substanțele care se livrează în general sub formă de paste se supun testului în stare uscată, dacă este posibil. Dacă substanța nu se poate prepara în stare uscată, pasta (după eliminarea cantității maxime posibile de diluant) se supune testului sub forma unei pelicule cu următoarele dimensiuni: 0,5 mm grosime, 2 mm lățime și 10 mm lungime, realizată cu un șablon.

▼B

1.6.3.3. *Desfășurarea testelor*

Bulonul din porțelan se așează deasupra eșantionului de testat și se aplică sarcina. În timpul testului, urmele lăsate de burete pe placa de porțelan trebuie să fie dispuse transversal față de direcția de deplasare. Bulonul trebuie să rămână pe eșantion, cantitatea de substanță de testat trebuie să fie suficientă, iar discul să se deplaseze corect sub bulon. Substanțele în formă de pastă se depun, cu un șablon, sub forma unei pelicule cu grosimea de 0,5 mm și 2 × 10 mm. Discul de porțelan trebuie să se deplaseze înainte și înapoi pe o distanță de 10 mm sub bulonul de porțelan timp de 0,44 secunde; cele două extremități ale fiecărui bulon se folosesc fiecare la două încercări și cele două suprafețe ale discului se utilizează fiecare la trei încercări.

Se realizează o serie de șase teste la o sarcină de 360 N. Dacă în aceste șase aceste teste se obține un rezultat pozitiv, trebuie să se mai realizeze o serie de șase teste cu o sarcină de 120 N. În alt aparat, proba se compară cu substanța de referință aleasă printr-o metodă stabilită (de exemplu metoda „up-and-down” etc.).

1.6.3.4. *Evaluarea*

Rezultatul se consideră pozitiv dacă se produce o explozie (pocnitură și/sau zgomot sau izbucnirea unei flăcări sunt echivalente cu o explozie) cel puțin o dată în oricare din teste cu aparatul de testare la frecare specificat sau sunt satisfăcute criteriile echivalente pentru o altă test de sensibilitate mecanică (la frecare).

2. **DATE**

În principiu, se consideră că o substanță prezintă pericol de explozie în sensul prezentei directive, în cazul în care se obține un rezultat pozitiv la testele de sensibilitate termică sau de sensibilitate mecanică (la șoc sau la frecare).

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, informațiile următoare:

— identitatea, compoziția, puritatea, conținutul de umiditate etc. al substanței de testat;

— starea fizică a probei și, dacă a fost sau nu mărunțită și/sau cernută;

— observațiile din timpul testelor de sensibilitate termică (de exemplu masa probei, numărul de fragmente etc.);

— observațiile din timpul testelor de sensibilitate mecanică (de exemplu formarea unor cantități importante de fum sau descompunerea totală fără zgomot, flăcări, scântei, pocnitură etc.);

— rezultatele fiecărui tip de test;

— dacă se utilizează alte aparate, trebuie să se prezinte fundamentarea științifică, precum și dovada corelației dintre rezultatele obținute cu aparatul specificat și cele obținute cu unul echivalent;

▼B

— orice observație utilă, cum ar fi trimiterea la teste cu produse similare care ar putea să fie relevante pentru o interpretare corectă a rezultatelor;

— orice alte constatări relevante pentru interpretarea rezultatelor.

3.2. INTERPRETAREA ŞI EVALUAREA REZULTATELOR

Raportul de testare menționează toate rezultatele considerate false, anormale sau nereprezentative. Dacă unele rezultate se resping, se prezintă o explicație și rezultatele unor teste suplimentare sau alternative. Cu excepția cazului în care un rezultat anormal se pot explica, acesta trebuie să fie acceptat ca atare și să fie folosit la clasificarea substanței în consecință.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

2. Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

3. Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.

4. NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use – Determination of explosion risk.

▼B

Apendice

Exemple de specificații ale materialelor pentru testul de sensibilitate termică (a se vedea DIN 1623)

1. Tubul: Specificațiile materialelor nr. 1.0336.505 g

2. Placa cu orificiu: Specificațiile materialelor nr. 1.4873

3. Flanșa filetată și piulița: Specificațiile materialelor nr. 1.3817

Figura 1

Aparatul de testare a sensibilității termice

(toate dimensiunile sunt date în milimetri)

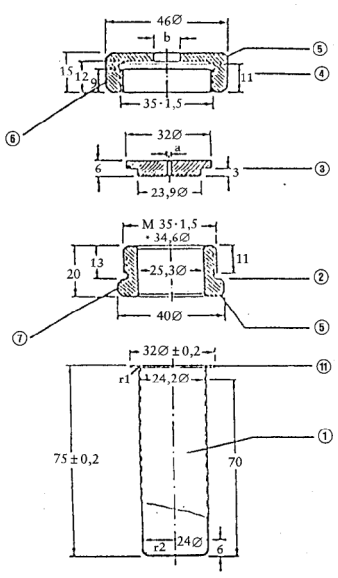


Figura 1a Tubul din oțel şi accesoriile

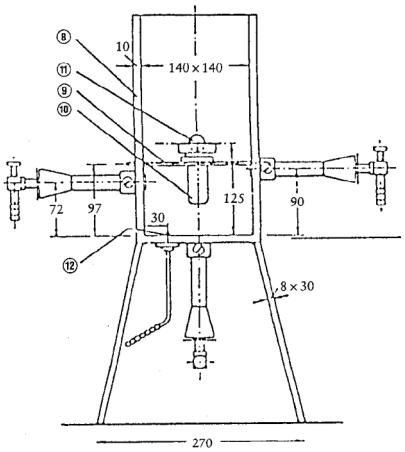


Figura 1b Dispozitivul de încălzire cu protecție

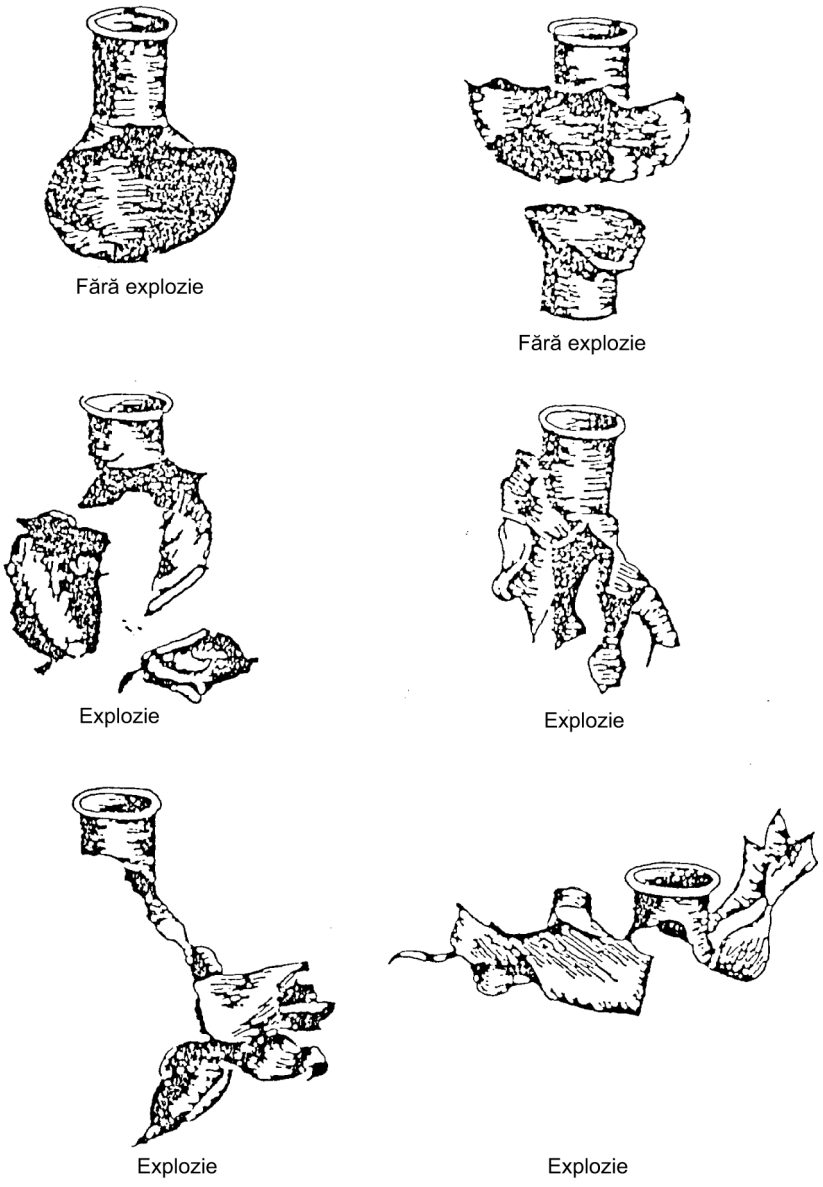
(1) tub
(1a) flanşă exterioară
(2) şaibă filetată; filet cu frecare mică
(3) placă cu orificiu a cu diametrul = 2,0 sau 6,0 mm
(4) piulița b cu diametrul = 10 mm
(5) suprafață teşită
(6) 2 teşituri pentru cheie de 41
(7) 2 teşituri pentru cheie de 36
(8) ecran de protecție împotriva aşchiilor
(9) 2 bare de susținere a tubului
(10) tub asamblat
(11) poziția arzătorului din spate; celelalte arzătoare sunt vizibile
(12) jet de comandă

▼B

Figura 2

Testul de sensibilitate termică

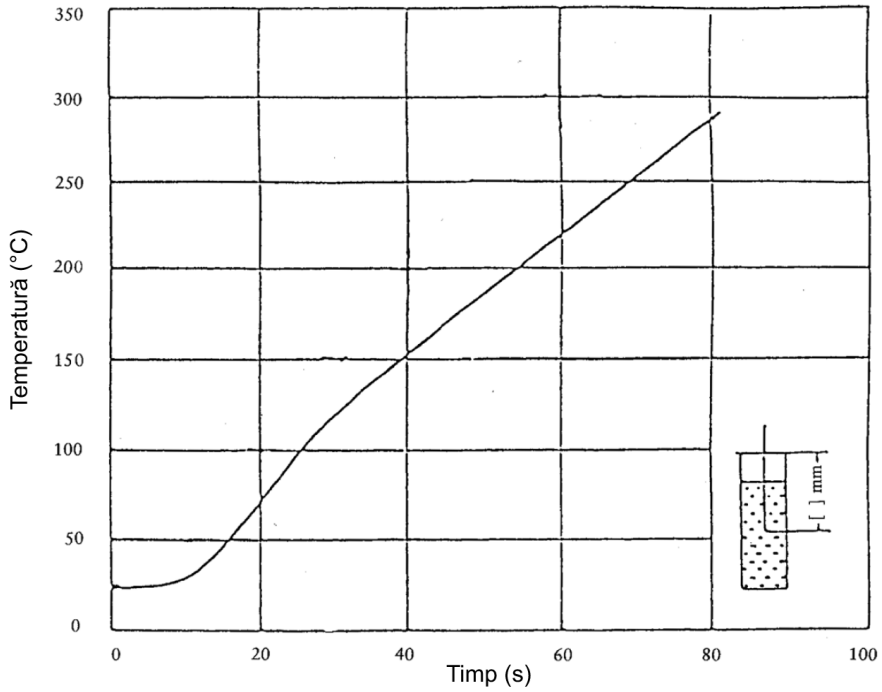
(Exemple de fragmentare)



▼B

Figura 3

Etalonarea vitezei de încălzire pentru testarea sensibilității termice



Curba temperatură/timp obținută la încălzirea dibutilftalatului (27 cm^3) într-un tub închis (placă cu orificiu de 1,5 mm) cu un debit de propan de 3,2 litri/minut. Temperatura se măsoară cu un termocuplu cromel/alumel placat cu oțel inoxidabil, cu diametrul de 1 mm, amplasat central la distanța de 43 mm sub bordura tubului. Viteza de încălzire în intervalul cuprins între 135 °C și 285 °C este între 185 și 215 K/minut.

▼B

Figura 4

Aparatul de testare a sensibilității mecanice (la șoc)

(toate dimensiunile în milimetri)

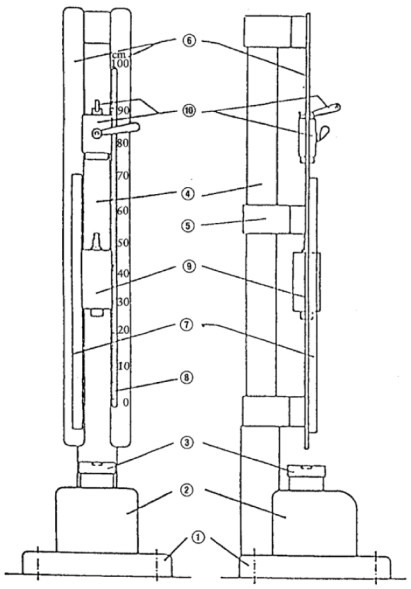


Figura 4a Sonetă, vedere frontală, laterală şi de ansamblu

(1) soclu, 450 × 450 × 60
(2) bloc de oțel, 230 × 250 × 200
(3) nicovală, diametru 100 × 70
(4) coloană
(5) traversă mediană
(6) 2 ghidaje
(7) cremalieră

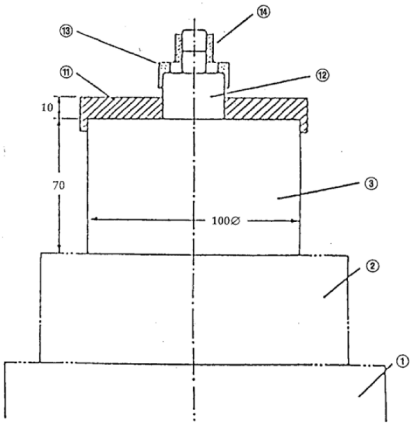


Figura 4b Sonetă, partea inferioară

(8) scală gradată
(9) ciocan de şoc (masa în cădere)
(10) dispozitiv de cuplare-decuplare
(11) placă de fixare
(12) nicovală intermediară (interschimbabilă), diametrul 26 x 26
(13) inel de fixare cu orificii
(14) dispozitiv de impact

▼B

Figura 4

Continuare

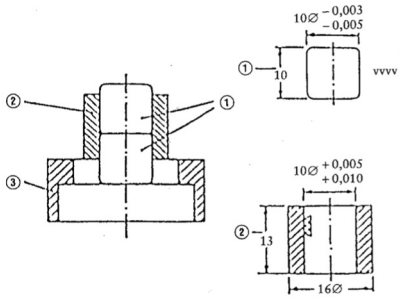
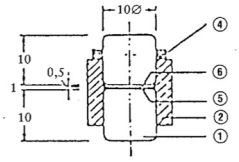


Figura 4c Dispozitivul de şoc pentru substanțele sub formă de pulberi sau pastă

Figura 4d Dispozitivul de şoc pentru substanțele lichide

(1) cilindri de oțel
(2) inel de ghidare pentru cilindrii din oțel
(3) inel de fixare cu orificii
(a) secțiune verticală
(b) vedere de sus
(4) inel din cauciuc
(5) substanță lichidă (40 mm^3)
(6) spațiu fără lichid



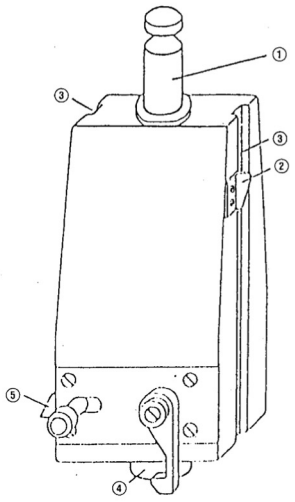


Figura 4e Ciocanul (masa de 5 kg în cădere)

(1) lagăr axial de suspendare
(2) indicator de înălțime
(3) canelură de poziționare
(4) cap cilindric de lovire
(5) opritor de recul

▼B

Figura 5

Aparatul de testare a sensibilității mecanice (la frecare)

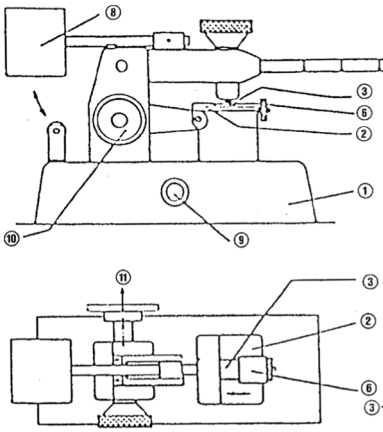


Figura 5a Aparat de testare a sensibilității mecanice (la frecare); vedere de ansamblu şi de sus

(1) soclul din oțel
(2) culisou
(3) disc din porțelan, 25 x 25 x 5 mm, opritor pe culisou
(4) bulon fix din porțelan, diametrul 10 x15 mm
(5) eşantion, aproximativ 10 mm^3
(6) locaşul bulonului

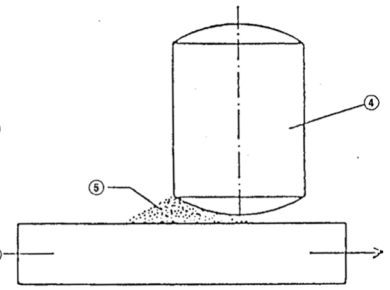


Figura 5b Poziția de pornire a ştiftului pe probă

(7) braț de încărcare
(8) contragreutate
(9) comutator
(10) roată pentru fixarea culisoului în poziția de pornire
(11) direcția motorului cu acționare electrică

▼B

A.15. PUNCTUL DE AUTOAPRINDERE (LICHIDE ȘI GAZE)

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Substanțele explozive și substanțele care se aprind spontan în contact cu aerul la temperatura ambiantă nu se supun prezentului test. Modul de operare este aplicabil la gaze, lichide și vapori care, în prezența aerului, se aprind la contactul cu o suprafață încălzită.

Punctul de autoaprindere scade considerabil prin influența impurităților catalitice existente, materialul suprafeței în contact sau prin creșterea volumului recipientului de testare.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Gradul de autoinflamabilitate se exprimă ca punct de autoaprindere. Punctul de autoaprindere este cea mai mică temperatură la care substanța se aprinde în contact cu aerul în condițiile definite în metoda de testare.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Substanțele de referință sunt specificate în standarde (a se vedea 1.6.3). Acestea trebuie să servească în special la verificarea periodică a acurateței metodei și să permită compararea cu rezultatele obținute prin alte metode.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Metoda determină temperatura minimă a suprafeței interioare a unei incinte, la care are loc aprinderea unui gaz, a vaporilor sau a unui lichid injectat în incinta respectivă.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Repetabilitatea variază în funcție de intervalul de temperaturi de autoaprindere și de metoda de testare folosită.

Sensibilitatea și specificitatea depind de metoda de testare folosită.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Aparatură**

Aparatura este descrisă în metoda menționată la punctul 1.6.3.

1.6.2. **Condiții experimentale**

Un eșantion din substanța de testat este supus testului conform metodei menționate la punctul 1.6.3.

1.6.3. **Desfășurarea testului**

A se vedea IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DATE**

Se înregistrează temperatura, presiunea atmosferică, cantitatea de probă utilizată și timpul scurs până la producerea aprinderii.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— specificațiile precise ale substanței (identificarea și proprietățile);

— cantitatea de probă utilizată, presiunea atmosferică;

— aparatura utilizată;

— rezultatele măsurătorilor (temperaturile de testare, rezultatele referitoare la aprindere, timpul scurs);

— toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Niciuna.

▼B

A.16. TEMPERATURA RELATIVĂ DE AUTOAPRINDERE PENTRU SUBSTANȚELE SOLIDE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Substanțele explozive și substanțele care se aprind spontan în contact cu aerul la temperatura ambiantă nu se supun prezentului test.

Scopul prezentului test este de a furniza informații preliminare privind autoaprinderea substanțelor solide la temperaturi ridicate.

Dacă temperatura degajată, fie prin reacția substanței cu oxigenul, fie prin descompunerea exotermă, nu se împrăștie destul de repede în mediul înconjurător, se produce autoîncălzirea care conduce la autoaprindere. Autoaprinderea se produce, prin urmare, atunci când viteza de producere a căldurii este mai mare decât viteza de pierdere a căldurii.

Metoda de testare este utilă ca test preliminar de triere a substanțelor solide. Având în vedere natura complexă a fenomenelor de aprindere și de combustie a solidelor, temperatura de autoaprindere determinată conform prezentei metode de testare se folosește numai pentru comparare.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Temperatura de autoaprindere determinată prin prezenta metodă este temperatura minimă a mediului ambiant, exprimată în ^{o}C, la care un volum determinat dintr-o substanță se aprinde în condiții definite.

1.3. SUBSTANȚĂ DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Un anumit volum din substanță se introduce într-o etuvă la temperatura camerei; în timp ce temperatura etuvei este crescută cu o viteză de 0,5 ^{o}C/min până la 400 ^{o}C sau până la punctul de topire, dacă este mai mic, se înregistrează curba temperatură/timp pentru condițiile din centrul eșantionului. În sensul prezentului test, temperatura etuvei la care temperatura eșantionului ajunge la 400 ^{o}C prin autoîncălzire se numește temperatură de autoaprindere.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Aparatură**

1.6.1.1. *Etuva*

Etuvă de laborator termoreglabilă (volum de aproximativ 2 litri) prevăzură cu circulație naturală de aer și o supapă pentru atenuarea exploziei. Pentru evitarea unui posibil risc de explozie, trebuie evitat contactul tuturor gazelor de descompunere cu elementele de încălzire electrică.

▼B

1.6.1.2. *Cubul din plasă metalică*

Se taie o bucată dintr-o plasă fin oțel inoxidabil cu ochiuri de 0,045 mm conform modelului din figura 1. Plasa se pliază și se fixează cu sârmă într-un cub deschis la partea superioară.

1.6.1.3. *Termocuplurile*

Termocupluri corespunzătoare.

1.6.1.4. *Înregistratorul*

Orice înregistrator cu două canale etalonat de la 0 la 600 °C sau la o tensiune corespunzătoare.

1.6.2. **Condiții experimentale**

Substanțele se supun testului în forma în care se primesc.

1.6.3. **Desfășurarea testului**

Cubul se umple cu substanță, se tasează ușor, adăugând substanță până la umplerea cubului. Cubul se suspendă apoi în centrul unei etuve la temperatura camerei. Un termocuplu se instalează în centrul cubului și celălalt între cub și peretele etuvei pentru înregistrarea temperaturii din etuvă.

Temperatura etuvei și cea a probei se înregistrează permanent în timpul creșterii temperaturii etuvei până la 400 °C sau până la punctul de topire, dacă este mai mic, cu o viteză de 0,5 °C/min.

Când substanța se aprinde, termocuplul probei va indica o creștere foarte bruscă a temperaturii, peste temperatura etuvei.

2. **DATE**

Temperatura etuvei la care temperatura probei ajunge la 400 °C prin autoîncălzire este importantă pentru evaluare (a se vedea figura 2).

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— descrierea substanței;

— rezultatele măsurătorilor, inclusiv curba temperatură/timp;

— toate observațiile suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

Figura 1

Modelul cubului de testare de 20 mm

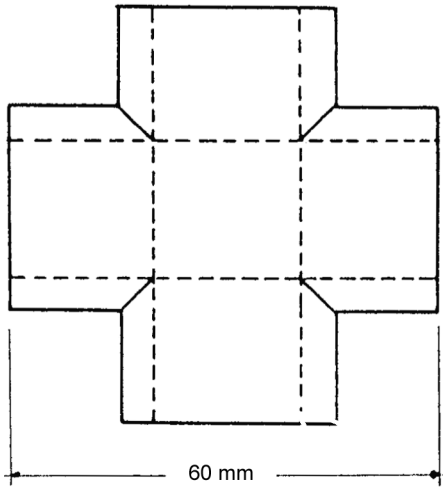
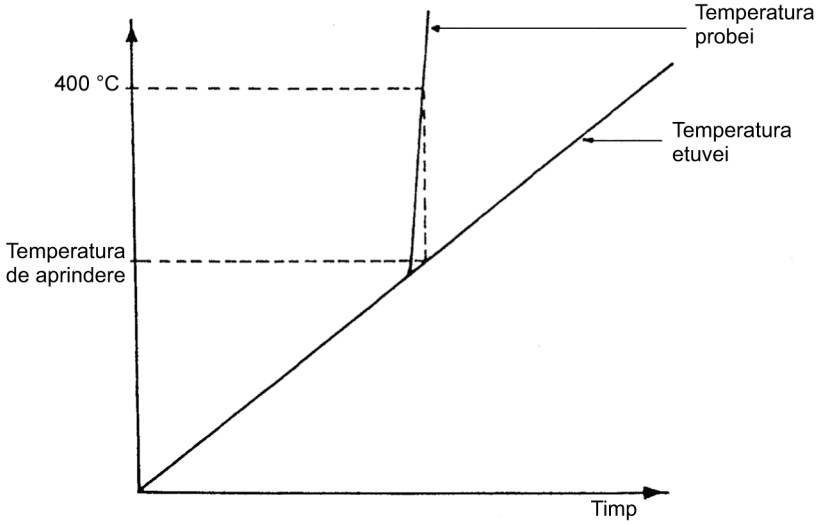


Figura 2

Curbă de tipul temperatură/timp



▼B

A.17. **PROPRIETĂȚI OXIDANTE (SOLIDE)**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Înainte de a realiza acest test, este util să se colecteze informații preliminare privind orice posibile proprietăți explozive ale substanței de testat.

Prezentul test nu se aplică lichidelor, gazelor, substanțelor explozive sau inflamabile sau peroxizilor organici.

Prezentul test nu este necesar dacă examinarea formulei structurale stabilește dincolo de orice îndoială că substanța nu are capacitate de reacție exotermă cu un material combustibil.

Pentru a stabili dacă sunt necesare precauții speciale în timpul testului, se realizează un test preliminar.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Timpul de ardere: timpul de reacție, exprimat în secunde, necesar pentru ca zona de reacție să traverseze un cartuș, în conformitate cu procedura descrisă la punctul 1.6.

Viteza de ardere: exprimată în milimetri pe secundă.

Viteza maximă de ardere: cea mai mare valoare a vitezelor de ardere obținută cu amestecuri ce conțin oxidant în proporție de 10-90 % greutate.

1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Azotatul de bariu (de puritate analitică) se folosește ca substanță de referință în test și în testul preliminar.

Amestecul de referință este amestecul constituit din azotat de bariu și pudră de celuloză, preparat conform descrierii de la punctul 1.6, care are viteza maximă de ardere (amestecul conține, de regulă, 60 % greutate azotat de bariu).

1.4. PRINCIPIUL METODEI

Pentru siguranță se realizează un test preliminar. În cazul în care testul preliminar indică în mod clar că substanța supusă testului are proprietăți oxidante, nu mai este necesar alt test. Dacă nu se întâmplă astfel, substanța se supune testului complet.

Pentru testul complet, se prepară amestecuri cu proporții diferite de substanță de testat și substanță combustibilă. Se prepară apoi câte un cartuș din fiecare amestec, care se aprinde la o extremitate.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Dacă este necesar, orice metodă de mărunțire și amestecare este valabilă, cu condiția ca diferența dintre viteza maximă de ardere și valoarea mediei aritmetice, în șase teste separate, să fie de maximum 10 %.

▼B

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Pregătire**

1.6.1.1. *Substanța de testat*

Proba de analizat se aduce la dimensiuni ale particulelor < 0,125 mm prin următoarea metodă: se cerne substanța, se mărunțește fracția rămasă, se repetă acțiunea până când întreaga cantitate de probă trece prin sită.

Se poate utiliza orice metodă de mărunțire sau cernere care satisface criteriile de calitate.

Înaintea preparării amestecului, substanța se usucă la 105 °C, până la o greutate constantă. Dacă temperatura de descompunere a substanței de testat este mai mică de 105 °C, substanța trebuie să se usuce la o temperatură mai mică.

1.6.1.2. *Substanța combustibilă*

Pulberea de celuloză se utilizează ca substanță combustibilă. Celuloza ar trebui să fie de tipul utilizat în cromatografia în strat subțire sau în cromatografia în coloană. S-a dovedit că tipul care conține mai mult de 85 % fibre cu lungimea de 0,020-0,075 mm este corespunzătoare. Pulberea de celuloză se trece printr-o sită cu ochiuri de 0,125 mm. Se folosește același lot de celuloză pentru tot testul.

Înainte de prepararea amestecului, pulberea de celuloză este uscată la 105 °C până se obține o greutate constantă.

Dacă în testul preliminar se utilizează rumeguș de lemn, se prepară un rumeguș prin colectarea porțiunii care trece prin sita cu ochiuri de 1,6 mm, se amestecă cu grijă, apoi se usucă la 105 °C timp de patru ore într-un strat cu o grosime de maximum 25 mm. Se răcește și se păstrează până când este necesar, de preferință într-un interval de 24 de ore de la uscare, într-un recipient etanș cât mai bine umplut.

1.6.1.3. *Sursa de ardere*

Ar trebui să se folosească flacăra unui bec de gaz (diametrul minim de 5 mm) ca sursă de aprindere. Dacă de utilizează altă sursă de aprindere (de exemplu la testul în atmosferă inertă), trebuie să se prezinte în raportul de testare descrierea și justificarea acesteia.

1.6.2. **Desfășurarea testului**

Notă:

Amestecurile din oxidanți și celuloză sau rumeguș trebuie să fie tratate ca posibil explozive și manipulate cu atenția cuvenită.

1.6.2.1. *Testul preliminar*

Substanța uscată se amestecă cu grijă cu celuloza uscată sau rumegușul uscat în proporții din greutate de substanță/celuloză sau rumeguș de 2:1 și din amestecul obținut se formează un cartuș conic cu dimensiunile 3,5 cm (diametrul la bază) × 2,5 cm (înălțimea) prin umplerea, fără îndesare, a unei forme conice (de exemplu o pâlnie din sticlă de laborator cu robinetul închis).

▼B

Cartușul este așezat pe o placă rece, necombustibilă, neporoasă și cu conductibilitate termică redusă. Testul ar trebui să se realizeze sub nișă de tiraj, conform descrierii de la punctul 1.6.2.2.

Sursa de aprindere se aduce în contact cu conul. Se urmăresc amploarea și durata reacției rezultate și se înregistrează.

Dacă reacția este viguroasă, substanța se consideră ca fiind oxidantă.

Dacă rezultatele nu sunt certe, este necesar să se realizeze testul complet descris în continuare.

1.6.2.2. *Test complet*

Se prepară amestecuri oxidant/celuloză ce conțin 10-90 % greutate oxidant, cu o rație de creștere de 10 % a cantității de oxidant. Pentru cazurile-limită, ar trebui să se utilizeze amestecuri intermediare oxidant/celuloză pentru a obține viteza maximă de ardere cu mai multă precizie.

Cartușul se obține cu o matriță. Matrița este din metal, are o lungime de 250 mm și o secțiune transversală triunghiulară cu o înălțime interioară de 10 mm și o lățime interioară de 20 mm. Pe ambele fețe ale matriței, pe direcție longitudinală, se montează două plăci metalice ca opritoare laterale care depășesc cu 2 mm extremitatea superioară a secțiunii transversale triunghiulare (figura). Dispozitivul obținut se umple fără tasare cu amestec, puțin în exces. După ce se lasă matrița să cadă de la o înălțime de 2 cm pe o suprafață solidă, substanța în exces se curăță cu o racletă oblică. Plăcile opritoare se scot și pulberea rămasă se netezește cu un rulou. Se așează apoi o placă cu conductibilitate termică mică, neporoasă și necombustibilă peste formă, ansamblul se răstoarnă și se scoate forma.

Se introduce cartușul în nișă, perpendicular pe direcția curentului de aer.

Viteza aerului trebuie să fie suficientă pentru a preveni răspândirea vaporilor în laborator și ar trebui să fie constantă în timpul testului. Curentul de aer trebuie să formeze un ecran în jurul aparatului.

Datorită caracterului higroscopic al celulozei și al unor substanțe de testat, testul se execută cât se poate de repede.

Se aprinde un capăt al cartușului prin contactul cu flacăra.

Se măsoară timpul de reacție pe o distanță de 200 mm după ce zona de reacție s-a propagat pe o distanță inițială de 30 mm.

Testul se realizează cu substanța de referință și cel puțin o dată cu fiecare amestec din gama celor constituite din substanța de testat și celuloză în diferite proporții.

Dacă se constată o viteză maximă de ardere cu mult mai mare decât cea a amestecului de referință, testul se poate opri; în caz contrar, testul se repetă de cinci ori pentru fiecare din cele trei amestecuri care au cea mai mare viteză de ardere.

▼B

Dacă se suspectează un rezultat fals pozitiv, atunci ar trebui să se repete testul cu o substanță inertă cu particule de dimensiuni similare, de exemplu kiselgur, în loc de celuloză. O altă posibilitate constă în repetarea testului cu amestecul cu viteza de ardere cea mai mare, în atmosferă inertă (cu un conținut de oxigen < 2 % v/v).

2. **DATE**

Din motive de siguranță, se consideră că viteza maximă de ardere – nu valoarea medie – reprezintă proprietatea oxidantă maximă a substanței supuse testului.

Valoarea cea mai mare a vitezei de ardere într-o serie de șase teste pe un amestec dat este relevantă pentru evaluare.

Se reprezintă grafic valoarea cea mai mare a vitezei de ardere pentru fiecare amestec în funcție de concentrația oxidantului. Din grafic se citește viteza maximă de ardere.

Cele șase valori ale vitezei de ardere măsurate într-un set realizat cu amestecul cu viteza maximă de ardere trebuie să difere cu maximum 10 % față de valoarea mediei aritmetice; în caz contrar, sunt necesare metode îmbunătățite de mărunțire și amestecare.

Se compară viteza maximă de ardere cu viteza maximă de ardere a amestecului de referință (a se vedea punctul 1.3).

Dacă încercările se realizează în atmosferă inertă, se compară viteza maximă de reacție cu cea obținută cu amestecul de referință în atmosferă inertă.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— identitatea, compoziția, puritatea, conținutul de umiditate etc. ale substanței de testat;

— orice tratament aplicat eșantionului (de exemplu măcinare, uscare,...);

— sursa de aprindere folosită;

— rezultatele măsurătorilor;

— tipul reacției (de exemplu ardere superficială cu flacără, ardere în întreaga masă, orice informații privind produsele de ardere, ...);

— orice observație suplimentară relevantă pentru interpretarea rezultatelor, inclusiv descrierea vigorii (flacără, scântei, degajare de vapori, ardere înăbușită încetă etc.) și durata aproximativă obținută în testul preliminar de siguranță/triere atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța de referință;

— rezultatele testelor cu substanță inertă, după caz;

— rezultatele testelor în atmosferă inertă, după caz.

▼B

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Se consideră că o substanță este substanță oxidantă, în cazul în care:

(a) la testul preliminar există o reacție viguroasă;

(b) la testul complet viteza maximă de ardere a amestecurilor testate este mai mare decât sau egală cu viteza maximă de ardere a amestecului de referință constituit din celuloză și azotat de bariu.

Pentru a se evita rezultatele fals pozitive, la interpretarea rezultatelor se iau în considerare și rezultatele obținute la testarea substanței cu un material inert și/sau la testul în atmosferă inertă.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

NF T 20-035 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

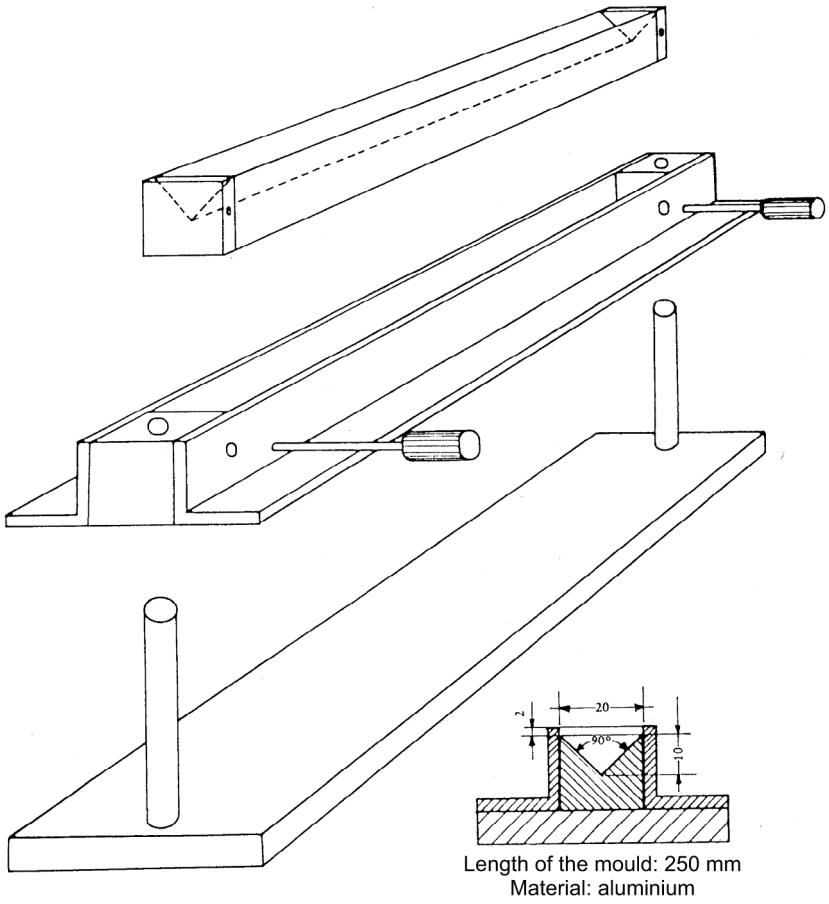
▼B

Apendice

Figură

Matrița și accesoriile pentru prepararea cartușului

(Toate dimensiunile sunt în milimetri)



▼B

A.18. **DETERMINAREA MASEI MOLECULARE NUMERICE MEDII ȘI A DISTRIBUȚIEI MASELOR MOLECULARE A POLIMERILOR**

1. **METODĂ**

Această metodă cromatografică pe gel permeabil urmează Orientarea 118 (1996) a OCDE. Principiile fundamentale și toate celelalte informații tehnice sunt prezentate în bibliografie.

1.1. INTRODUCERE

Proprietățile polimerilor sunt atât de diversificate, încât este imposibil de descris o metodă unică, care să indice cu precizie condițiile de separare și evaluare, care să acopere toate eventualitățile și particularitățile întâlnite la separarea polimerilor. Sistemele complexe de polimeri, în special, se pretează mai rar la cromatografia pe gel permeabil. În cazul în care cromatografia pe gel permeabil nu este aplicabilă, se poate determina conținutul de polimeri cu masă moleculară medie, utilizând alte metode (a se vedea apendicele). Într-o astfel de situație, este necesară furnizarea tuturor detaliilor legate de metoda folosită, cu justificarea alegerii.

Metoda descrisă în continuare se bazează pe norma DIN 55672 (1). Aceasta furnizează indicații detaliate asupra modului de realizare a experiențelor și de evaluare a rezultatelor. Dacă este necesară modificarea condițiilor experimentale, schimbările trebuie justificate. Pot fi utilizate alte normative, cu condiția menționării tuturor referințelor. Metoda descrisă utilizează pentru etalonare eșantioane de polistiren a căror polidispersie este cunoscută și ar putea fi, probabil, adaptată pentru cazul altor polimeri, de exemplu, polimerii solubili în apă și polimerii ramificați cu catenă lungă.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Masa moleculară numerică medie M_n și masa moleculară medie ponderală M_w, se determină prin ecuațiile următoare:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

unde:

H_i este amplitudinea semnalului detectat, corespunzător volumului de retenție V_i, față de nivelul de referință;

M_i este masa moleculară a fracțiunii de polimer, corespunzătoare volumului de retenție V_i și

n este numărul de puncte experimentale.

Lărgimea distribuției maselor moleculare, care reprezintă o măsură a polidispersiei sistemului, este exprimată de raportul M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Metoda cromatografiei pe gel permeabil este o metodă relativă, fiind necesar să se procedeze la o etalonare. În general, aceasta se realizează cu ajutorul polistirenilor etalon cu lanț liniar și distribuție îngustă, pentru care se cunosc atât masele moleculare medii M_n și M_w, cât și distribuția maselor moleculare. Curba de etalonare nu poate fi utilizată pentru determinarea masei moleculare a unui eșantion necunoscut, decât dacă condițiile de separare a eșantioanelor și etaloanelor au fost selecționate într-un mod identic.

O relație determinată între masa moleculară și volumul de eluare nu este valabilă decât în condițiile particulare ale unei experiențe date. Printre aceste condiții figurează, înainte de toate: temperatura, solventul (sau amestecul de solvenți), condițiile cromatografice, precum și coloana de separare sau sistemul de coloane.

Masele moleculare ale eșantioanelor determinate prin această metodă constituie valori relative; le vom numi „mase moleculare în echivalent-polistiren”. Aceasta semnifică faptul că, în funcție de diferențele chimice și structurale dintre eșantioanele testate și etaloane, masele moleculare pot devia față de valorile absolute, într-o manieră mai mult sau mai puțin importantă. Dacă sunt utilizate alte etaloane, de exemplu, polietilenglicol, poli(etilenoxid), poli(metacrilat de metil) sau acid poliacrilic, este important să se justifice motivul.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Cromatografia pe gel permeabil permite determinarea distribuției maselor moleculare, precum și a maselor moleculare medii (M_n, M_w). Cromatografia pe gel permeabil reprezintă o metodă particulară de cromatografie lichidă, în cadrul căreia eșantionul pentru testat este separat în funcție de volumul hidrodinamic al fiecărui constituent (2).

Separarea se efectuează pe măsură ce eșantionul înaintează printr-o coloană umplută cu un material poros, în general un gel organic. Moleculele mici pot penetra în pori, în vreme ce moleculele mari sunt excluse. Din acest motiv, traseul moleculelor mari este mai scurt; acestea sunt separate primele. Moleculele de dimensiuni medii penetrează parțial în pori, fiind separate mai târziu. Moleculele cele mai mici, a căror rază hidrodinamică medie este mai mică decât cea a porilor de gel, pot penetra în toți porii. Acestea vor fi eluate ultimele.

În situația ideală, dimensiunea speciilor moleculare este cea care decide integral separarea, dar în practică, este greu de evitat interferența unor fenomene de absorbție. O umplere neregulată a coloanei, ca și existența unui volum mort important, pot agrava situația (2).

Detecția se efectuează, de exemplu, prin măsurarea indicelui de refracție sau al absorbției în UV, pentru realizarea unei curbe de distribuție simple. Totuși, pentru a putea asocia acestei curbe valorile maselor moleculare reale, este necesară etalonarea coloanei prin trecerea unui polimer cu masa moleculară cunoscută și, în cazul ideal, cu o structură cât mai apropiată, de exemplu diferiți polistireni standard. În general, se va obține o curbă Gauss; uneori, aceasta poate prezenta o asimetrie, pe partea maselor moleculare mici; axa verticală indică cantitatea (greutatea) speciilor de diferite mase moleculare eluate, iar pe axa orizontală, figurează logaritmul masei moleculare.

▼B

1.5. CRITERII DE CALITATE

Reproductivitatea (deviația-standard relativă) a volumului de eluare trebuie să fie cel mult egală cu 0,3 %. Există modalități de ameliorare a reproductivității de analiză, grație unei corecții ce utilizează un standard intern, dacă un cromatograf este evaluat în funcție de timp și nu satisface criteriile menționate mai sus [a se vedea informațiile complementare la referința (1)]. Polidispersările depind de masele moleculare ale etaloanelor. În cazul polistirenilor etalon, valorile tipice sunt:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p este masa moleculară a etalonului, corespunzătoare semnalului maxim)

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Prepararea soluțiilor etalon de polistiren**

Se vor dizolva polistirenii etalon, amestecând cu grijă până la diluția aleasă. Soluțiile se vor prepara ținând cont de recomandările fabricantului.

Concentrațiile etaloanelor alese depind de diferiți factori, cum ar fi: volumul de injecție, viscozitatea soluției și sensibilitatea detectorului. Volumul de injecție maxim trebuie să fie adaptat lungimii coloanei, având grijă să nu o supraîncarce. Volumele de injecție curente pentru separările analitice prin metoda cromatografică pe gel permeabil, pentru o coloană de 30 cm × 7,8 mm, variază de obicei între 40 și 100 µl. Se va determina raportul optim între volumul de injecție și concentrație, înainte de etalonarea coloanei.

1.6.2. **Prepararea soluției de eșantion**

În principiu, prepararea soluțiilor de eșantion se realizează în condiții identice. Eșantionul se dizolvă într-un solvent adecvat, de exemplu THF, agitând cu grijă. În niciun caz, nu se va dizolva într-o baie cu ultrasunete. Dacă este necesar, soluția de probă se purifică cu ajutorul unui filtru cu membrană, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 0,2-2 µm.

Prezența particulelor nedizolvate trebuie menționată în raportul final, în măsura în care acestea pot rezulta din specii cu mase moleculare mari. Trebuie să se recurgă la o metodă potrivită pentru determinarea procentajului în greutate a particulelor nedizolvate. Analiza soluțiilor se va face în termen de 24 ore.

1.6.3. **Aparatură**

— un rezervor pentru solvent;

— un sistem pentru degazare (dacă este necesar);

— o pompă;

▼B

— un amortizor de impulsuri (dacă este necesar);

— un sistem de injecție;

— coloane cromatografice;

— un detector;

— un debitmetru (dacă este necesar);

— un sistem de înregistrare și tratare a datelor;

— un recipient pentru recuperarea soluțiilor utilizate.

Sistemul cromatografic pe gel permeabil trebuie să fie inert față de solventul utilizat (de exemplu, utilizarea capilarelor din oțel, atunci când solvent este THF).

1.6.4. **Injecția și sistemul de pompare a solventului**

Un volum definit din soluția de probă este injectat în coloană, într-o zonă bine definită, cu ajutorul unui aparat pentru eșantionare automată sau manuală. Dacă se operează manual, retragerea ori împingerea prea bruscă a pistonului seringii poate determina modificări în distribuția maselor moleculare observate. Este indicat ca sistemul de pompare a solventului să fie lipsit de pulsații; este de preferat ca acesta să includă un amortizor de impulsuri. Debitul este de ordinul a 1 ml/min.

1.6.5. **Coloana**

În funcție de natura eșantionului testat, polimerul se caracterizează făcând recurs la o singură coloană sau la mai multe coloane, conectate în serie. În comerț sunt disponibile mai multe materiale poroase pentru coloane, cu proprietăți definite (de exemplu, dimensiunea porilor, limita de excludere). Alegerea unui gel de separare sau a lungimii de coloană depinde, pe de o parte, de proprietățile eșantionului testat (volume hidrodinamice, distribuția maselor moleculare) și, pe de altă parte, de condițiile particulare ale separării, cum ar fi: natura solventului, temperatura și debitul (1) (2) (3).

1.6.6. **Talere teoretice**

Coloana (sau combinația de coloane) utilizată pentru separare trebuie caracterizată prin numărul de talere teoretice. Pentru aceasta, în cazul în care solventul de eluare este THF, se trece o soluție de etilbenzen sau o altă substanță dizolvată nepolară potrivită, printr-o coloană de lungime cunoscută. Numărul de talere teoretice este dat de ecuația următoare:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{sau} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

unde:

N = numărul de talere teoretice

V_e = volumul de eluare, corespunzător semnalului maxim

▼B

W = lărgimea semnalului maxim, la nivelul liniei de bază

$W_{1/2}$ = este lărgimea semnalului maxim, la jumătatea înălțimii coloanei

1.6.7. **Eficacitatea separării**

În afară de numărul de talere teoretice, parametru determinant al lărgimii de bandă, eficacitatea de separare este o altă importantă caracteristică, determinată de panta curbei de calibrare. Eficacitatea de separare a unei coloane se calculează cu ajutorul relației următoare:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secțiunea coloanei}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

unde:

$V_{e,\ M_x}$ = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară M_x

$V_{e,(10.M_x)}$= volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară de 10 ori mai mare

Rezoluția sistemului este în general definită după cum urmează:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

unde:

V_{e1}, V_{e2} = volumele de eluare ale celor doi polistireni standard la semnalul maxim

W_1, W_2 = lărgimile vârfului la nivelul liniei bazei

M_1, M_2 = masele moleculare corespunzătoare semnalului maxim (aceste mase ar trebui să fie diferite printr-un factor 10)

Valoarea lui R pentru sistemul de coloane trebuie să fie superioară valorii de 1,7 (4).

1.6.8. **Solvenți**

Toți solvenții trebuie să aibă o mare puritate (se va folosi THF de puritate 99,5 %). Rezervorul pentru solvent (la nevoie, pus în atmosferă de gaz inert), trebuie să fie suficient de mare pentru a permite etalonarea coloanei și mai multe analize de eșantioane. Solventul va fi degazat înainte de a fi pompat în coloană.

1.6.9. **Reglarea temperaturii**

Temperatura componentelor interne critice (bucla de injecție, coloana sau coloanele, detectorul și tuburile) trebuie să fie constantă și compatibilă cu solventul ales.

▼B

1.6.10. **Detectorul**

Detectorul înregistrează în mod cantitativ concentrația eșantionului eluat din coloană. Pentru evitarea unei lărgimi nedorite a picului, volumul cuvei detectorului va fi ales cât mai mic posibil. Acesta nu trebuie să depășească 10 µl, cu excepția detectoarelor ce funcționează prin difuzia luminii și a viscozimetrelor. În general, detecția se realizează prin refractometrie diferențială. Totuși, dacă proprietățile specifice ale eșantionului sau ale solventului pentru eluare o cer, se pot folosi alte tipuri de detectoare, cum ar fi cele UV/VIS sau IR, viscozimetrele etc.

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Se va face referință la normele DIN (1) în ceea ce privește criteriile de evaluare detaliate, la fel pentru specificațiile relative la colectarea și interpretarea datelor.

Pentru fiecare eșantion analizat, se vor realiza două experiențe independente. Rezultatele acestora se vor analiza separat.

Parametrii M_n, M_w, M_w/M_n, M_p se determină pentru fiecare măsurătoare. Trebuie indicat în mod explicit că valorile măsurate sunt valori relative corespunzând unor echivalenți de masă moleculară ale standardului folosit.

După determinarea volumelor și a timpilor de retenție (eventual corectate cu ajutorul unui standard intern) se vor reprezenta grafic valorile log M_P (M_P fiind semnalul maxim al polimerilor standard), în funcție de una dintre acele cantități. Sunt necesare cel puțin 2 puncte de etalonare pentru fiecare factor 10 de masă moleculară. Pentru trasarea întregii curbe sunt necesare cel puțin 5 puncte de măsură; această curbă va acoperi masa moleculară estimată a eșantionului. Punctul extrem al curbei de etalonare, spre partea maselor moleculare mici, se poate defini folosind n-hexilbenzenul sau altă substanță dizolvată nepolară adecvată. Masele moleculare medii, ca număr și ca greutate, sunt în general determinate prin prelucrarea informatică a datelor, bazată pe formule menționate la punctul 1.2. Dacă s-a optat pentru o prelucrare manuală, este indicat să se consulte ASTM D 3536-91 (3).

Curba de distribuție va fi prezentată sub forma unui tabel sau a unui grafic (frecvența diferențială sau procentajele cumulative în funcție de log M). În cazul reprezentării grafice, o putere de 10 pentru masa moleculară corespunde în mod normal, unei lărgimi de aproximativ 4 cm, în vreme ce pentru maximul de semnal, este adecvată o înălțime de aproximativ 8 cm. În cazul curbelor de distribuție cumulative, diferența între 0 și 100 % pe axa ordonatei trebuie să fie în jur de 10 cm.

2.2. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare va cuprinde informațiile următoare:

2.2.1. **Substanța testată:**

— informații disponibile legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități);

▼B

— descrierea tratamentului aplicat eșantionului, observații, probleme.

2.2.2. **Dispozitivul experimental:**

— un rezervor pentru solvent, gaz inert, sistem pentru degazarea solventului, compoziția solventului, impurități;

— pompă, amortizor de impulsuri, sistem de injecție;

— coloane de separare (fabricant, toate precizările legate de caracteristicile coloanei, cum ar fi dimensiunea porilor, natura materialului de separare etc., numărul, lungimea și ordinul coloanelor utilizate);

— numărul de talere teoretice ale coloanei (sau al combinației de coloane), eficacitatea separării (resorbția sistemului);

— informații legate de simetria semnalelor maxime;

— temperatura coloanei, modul de reglare a temperaturii;

— detector (principiul de măsurare, tip, volumul cuvei);

— debitmetru dacă există (fabricant, principiul de măsurare);

— sistemul utilizat pentru culegere și prelucrarea datelor (echipament și programe informatice).

2.2.3. **Etalonarea sistemului:**

— descrierea detaliată a metodei utilizate pentru determinarea curbei de etalonare;

— precizări asupra criteriilor de calitate proprii acestei metode (de exemplu, coeficientul de corelare, eroarea pătratică medie etc.);

— informații asupra tuturor extrapolărilor, ipotezelor și aproximărilor efectuate în cursul proceselor experimentale, precum și asupra evaluării și prelucrării datelor;

— toate măsurătorile efectuate pentru stabilirea curbei de etalonare trebuie prezentate sub forma unui tabel, care cuprinde, pentru fiecare punct de etalonare, următoarele informații:

  — denumirea eșantionului;

  — fabricantul eșantionului;

  — valorile caracteristice M_p, M_n, M_w, M_w/M_n ale etaloanelor furnizate de fabricant, deduse din măsurătorile ulterioare, completate de indicațiile legate de metoda de determinare;

  — volumul de injecție și concentrația soluției injectate;

▼B

— valoarea de M_p utilizată pentru etalonare;

— volumul de eluare sau timpul de retenție corectat, măsurat la semnalul maxim;

— M_p calculat la semnalul maxim;

— procentajul de eroare la M_p calculat și la valoarea de etalonare.

2.2.4. **Evaluare:**

— evaluare în funcție de timp: toate metodele care vizează ameliorarea reproductivității cerute (metode de corecție, standard intern etc.);

— se precizează dacă evaluarea s-a efectuat plecând de la volumul de eluare sau de la timpul de retenție;

— se indică limitele de evaluare, dacă un pic nu a fost complet analizat;

— se descriu metodele de netezire, dacă s-au folosit;

— se indică procedeelor de preparare și pretratare a eșantionului;

— dacă există, se indică prezența particulelor nedizolvate;

— se indică volumul de injecție (µl) și concentrația de injecție (mg/ml);

— se menționează observațiile privind efectele generatoare de deviații, în raport cu profilul ideal de cromatografie pe gel permeabil;

— se descriu în detaliu toate modificările aduse procedurilor de analiză;

— se precizează intervalele de eroare;

— se consemnează orice alte informații și observații utile pentru interpretarea rezultatelor.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apendice

Exemple de alte metode de determinare a masei moleculare numerice medii (Mn) a polimerilor

Cromatografia pe gel permeabil reprezintă metoda preferată pentru determinarea M_n, mai ales atunci când dispunem de un ansamblu de substanțe standard cu o structură comparabilă cu cea a polimerului. Totuși, atunci când folosirea metodei cromatografiei pe gel permeabil prezintă dificultăți practice sau când ne putem aștepta ca substanța să nu satisfacă un criteriu reglementar pentru M_n (ceea ce cere o confirmare), există metode alternative, ca de exemplu:

1. **Utilizarea proprietăților coligative**

1.1. Ebulioscopia și crioscopia

înseamnă măsurarea creșterii punctului de fierbere (ebulioscopia) sau coborârea punctului de congelare (crioscopia) ale unui solvent atunci când este adăugat un polimer. Metoda se bazează pe faptul că dizolvarea unui polimer într-un lichid are un efect asupra punctelor de fierbere sau de congelare ale acestuia care depinde de masa moleculară a polimerului (1) (2).

Domeniul de aplicare corespunde unei $M_n < 20\,000$.

1.2. Coborârea presiunii vaporilor

constă în măsurarea presiunii vaporilor unui lichid de referință înainte și după adăugarea unor cantități stabilite de polimeri (1) (2).

Domeniul de aplicare corespunde unei $M_n < 20\,000$ (în teorie; în practică, nu reprezintă decât o valoare limitată).

1.3. Osmometria cu membrană

se bazează pe principiul osmozei, adică tendința naturală a moleculelor de solvent de a traversa o membrană semipermeabilă plecând de la o soluție diluată către o soluție concentrată așa încât să se realizeze echilibrul. În experiment, concentrația soluției diluate este nulă, în timp ce soluția concentrată conține polimerul. Trecerea solventului de-a lungul membranei induce o diferență de presiune care depinde de concentrație și de masa moleculară a polimerului (1) (3) (4).

Domeniul de aplicare corespunde valorilor lui M_n între 20 000 și 200 000.

1.4. Osmometria – faza de vapori

constă în comparația vitezei de evaporare a unui aerosol de solvent pur cu viteza a cel puțin trei aerosoli care conțin polimerul la diferite concentrații (1) (5) (6).

Domeniul de aplicare corespunde unei $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analiza grupurilor terminale**

Pentru a se utiliza această metodă, trebuie cunoscute atât structura globală a polimerului, cât și natura grupurilor terminale situate în capetele catenei (acestea trebuie să poată fi diferențiate de catena principală, de exemplu, prin spectrul lor RMN sau prin titrarea și formarea derivaților). Determinarea concentrației moleculare a grupurilor terminale prezente pe polimer poate, apoi, să furnizeze o valoare a masei moleculare (7) (8) (9).

Domeniul de aplicare corespunde valorilor lui M_n ce pot atinge valoarea de 50 000 (cu o fiabilitate descrescătoare)

3. **Referințe bibliografice**

1. Billmeyer, F.W. Jr., (1984), Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2. Glover, C.A., (1975), Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3. ASTM D 3750-79, (1979), Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

5. ASTM 3592-77, (1977), Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6. Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7. Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989), Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8. Garmon, R.G., (1975), End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

9. Amiya, S., et al. (1990), Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN POLIMERI CU MASĂ MOLECULARĂ MICĂ

1. METODĂ

Această metodă cromatografică pe gel permeabil urmează Orientarea 118 (1996) a OCDE. Principiile fundamentale și toate celelalte informații tehnice sunt prezentate în bibliografie.

1.1. INTRODUCERE

Proprietățile polimerilor sunt atât de diversificate, încât este imposibil de descris o metodă unică, care să indice cu precizie condițiile de separare și evaluare, care să acopere toate eventualitățile și particularitățile întâlnite la separarea polimerilor. Sistemele complexe de polimeri, în special, se pretează mai rar la cromatografia pe gel permeabil. În cazul în care cromatografia pe gel permeabil nu este aplicabilă, se poate determina conținutul de polimeri cu masă moleculară medie, utilizând alte metode (a se vedea apendicele). Într-o astfel de situație, este necesară furnizarea tuturor detaliilor legate de metoda folosită, cu justificarea alegerii.

Metoda descrisă în continuare se bazează pe norma DIN 55672 (1). Aceasta furnizează indicații detaliate asupra modului de realizare a experiențelor și de evaluare a rezultatelor. Dacă este necesară modificarea condițiilor experimentale, schimbările trebuie justificate. Pot fi utilizate alte normative, cu condiția menționării tuturor referințelor. Metoda descrisă utilizează pentru etalonare eșantioane de polistiren a căror polidispersie este cunoscută și ar putea fi, probabil, adaptată pentru cazul altor polimeri, de exemplu, polimerii solubili în apă și polimerii ramificați cu catenă lungă.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Masa moleculară mică se definește în mod arbitrar ca fiind o masă moleculară inferioară celei de 1 000 daltoni.

Masa moleculară medie (numerică) M_n și masa moleculară medie (greutate) M_w, sunt determinate cu ajutorul ecuațiilor următoare:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

unde:

H_i = amplitudinea semnalului detectat, corespunzător volumului de retenție V_i, în funcție de nivelul de referință,

M_i = este masa moleculară a fracțiunii de polimer, corespunzătoare volumului de retenție V_i și n este numărul de puncte experimentale

Lărgimea de distribuție a maselor moleculare, care reprezintă o măsură a polidispersiei sistemului, este exprimată de raportul M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Metoda cromatografiei pe gel permeabil este o metodă relativă, fiind necesar să se procedeze la o etalonare. În general, aceasta se realizează cu ajutorul polistirenilor etalon cu lanț liniar și distribuție îngustă, pentru care se cunosc atât masele moleculare medii M_n și M_w, cât și distribuția maselor moleculare. Curba de etalonare nu poate fi utilizată pentru determinarea masei moleculare a unui eșantion necunoscut, decât dacă condițiile de separare a eșantioanelor și etaloanelor au fost selecționate într-un mod identic.

O relație determinată între masa moleculară și volumul de eluare nu este valabilă decât în condițiile particulare ale unei experiențe date. Printre aceste condiții figurează, înainte de toate: temperatura, solventul (sau amestecul de solvenți), condițiile cromatografice, precum și coloana de separare sau sistemul de coloane.

Masele moleculare ale eșantioanelor determinate prin această metodă constituie valori relative; le vom numi „mase moleculare în echivalent-polistiren”. Aceasta semnifică faptul că, în funcție de diferențele chimice și structurale dintre eșantioanele testate și etaloane, masele moleculare pot devia față de valorile absolute, într-o manieră mai mult sau mai puțin importantă. Dacă sunt utilizate alte etaloane, de exemplu, polietilenglicol, poli(etilenoxid), poli(metacrilat de metil) sau acid poliacrilic, este important să se justifice motivul.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Cromatografia pe gel permeabil permite determinarea distribuției maselor moleculare, precum și a maselor moleculare medii (M_n, M_w). Cromatografia pe gel permeabil reprezintă o metodă particulară de cromatografie lichidă, în cadrul căreia eșantionul pentru testat este separat în funcție de volumul hidrodinamic al fiecărui constituent (2).

Separarea se efectuează pe măsură ce eșantionul înaintează printr-o coloană umplută cu un material poros, în general un gel organic. Moleculele mici pot penetra în pori, în vreme ce moleculele mari sunt excluse. Din acest motiv, traseul moleculelor mari este mai scurt; acestea sunt separate primele. Moleculele de dimensiuni medii penetrează parțial în pori, fiind separate mai târziu. Moleculele cele mai mici, a căror rază hidrodinamică medie este mai mică decât cea a porilor de gel, pot penetra în toți porii. Acestea vor fi eluate ultimele.

În situația ideală, dimensiunea speciilor moleculare este cea care decide integral separarea, dar în practică, este greu de evitat interferența unor fenomene de absorbție. O umplere neregulată a coloanei, ca și existența unui volum mort important, pot agrava situația (2).

Detecția se efectuează, de exemplu, prin măsurarea indicelui de refracție sau al absorbției în UV, pentru realizarea unei curbe de distribuție simple. Totuși, pentru a putea asocia acestei curbe valorile maselor moleculare reale, este necesară etalonarea coloanei prin trecerea unui polimer cu masa moleculară cunoscută și, în cazul ideal, cu o structură cât mai apropiată, de exemplu diferiți polistireni standard. În general, se va obține o curbă Gauss; uneori, aceasta poate prezenta o asimetrie, pe partea maselor moleculare mici; axa verticală indică cantitatea (greutatea) speciilor de diferite mase moleculare eluate, iar pe axa orizontală, figurează logaritmul masei moleculare.

▼B

Conținutul în polimeri cu masă moleculară mică se deduce cu ajutorul acestei curbe. Calculul nu poate fi exact decât dacă speciile cu masă moleculară mică se comportă în același fel cu ansamblul polimerului, pe unitatea de masă.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Reproductivitatea (deviația-standard relativă) a volumului de eluare trebuie să fie cel mult egală cu 0,3 %. Există modalități de ameliorare a reproductivității de analiză, grație unei corecții ce utilizează un standard intern, dacă un cromatograf este evaluat în funcție de timp și nu satisface criteriile menționate mai sus (a se vedea informațiile complementare la referința 1). Polidispersările depind de masele moleculare ale etaloanelor. În cazul polistirenilor etalon, valorile tipice sunt:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p este masa moleculară a etalonului, corespunzătoare semnalului maxim)

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Prepararea soluțiilor etalon de polistiren**

Se vor dizolva polistirenii etalon, amestecând cu grijă până la diluția aleasă. Soluțiile se vor prepara ținând cont de recomandările fabricantului.

Concentrațiile etaloanelor alese depind de diferiți factori, cum ar fi: volumul de injecție, viscozitatea soluției și sensibilitatea detectorului. Volumul de injecție maxim trebuie să fie adaptat lungimii coloanei, având grijă să nu o supraîncarce. Volumele de injecție curente pentru separările analitice prin metoda cromatografică pe gel permeabil, pentru o coloană de 30 cm × 7,8 mm, variază de obicei între 40 și 100 µl. Se va determina raportul optim între volumul de injecție și concentrație, înainte de etalonarea coloanei.

1.6.2. **Prepararea soluțiilor de eșantion**

În principiu, prepararea soluțiilor de eșantion se realizează în condiții identice. Eșantionul se dizolvă într-un solvent adecvat, de exemplu THF, agitând cu grijă. În niciun caz nu se va dizolva într-o baie cu ultrasunete. Dacă este necesar, soluția de probă se purifică cu ajutorul unui filtru cu membrană, cu dimensiunea porilor cuprinsă între 0,2-2 µm.

Prezența particulelor nedizolvate trebuie menționată în raportul final, în măsura în care acestea pot rezulta din specii cu mase moleculare mari. Trebuie să se recurgă la o metodă potrivită pentru determinarea procentajului în greutate a particulelor nedizolvate. Analiza soluțiilor se va face în termen de 24 ore.

▼B

1.6.3. **Corecție legată de prezența impurităților și a aditivilor**

Fiind vorba despre conținutul în specii cu M < 1 000, pentru care este necesar, în general, să se aplice o corecție care să țină cont de prezența compușilor particulari nepolimerici (cum ar fi impuritățile sau aditivii), cu excepția cazului în care conținutul măsurat nu depășește valoarea de 1 %. Această corecție se poate realiza prin analiza directă a soluției de polimer sau a eluatului pentru cromatografia pe gel permeabil.

În cazul în care eluatul este prea diluat pentru a permite analizarea, după traversarea coloanei, este necesar să fie concentrat. Va fi, eventual, necesară evaporarea soluției până la sec, urmată de redizolvare. Concentrarea soluției se va efectua astfel încât să nu intervină nicio modificare a compoziției. Tratamentul soluției, după faza cromatografiei pe gel permeabil, este funcție de metoda de analiză utilizată pentru determinarea cantitativă.

1.6.4. **Aparatură**

Un aparat pentru cromatografie pe gel permeabil este compus din următoarele elemente:

— un rezervor pentru solvent;

— un sistem pentru degazare (dacă este necesar);

— o pompă;

— un amortizor de impulsuri (dacă este necesar);

— un sistem de injecție;

— coloane cromatografice;

— un detector;

— un debitmetru (dacă este necesar);

— un sistem de înregistrare și tratare a datelor;

— un recipient pentru recuperarea soluțiilor utilizate.

Sistemul cromatografic pe gel permeabil trebuie să fie inert față de solventul utilizat (de exemplu, utilizarea capilarelor din oțel, atunci când solvent este THF).

1.6.5. **Injecția și sistemul de pompare a solventului**

Un volum definit din soluția de probă este injectat în coloană, într-o zonă bine definită, cu ajutorul unui aparat pentru eșantionare automată sau manuală. Dacă se operează manual, retragerea ori împingerea prea bruscă a pistonului seringii poate determina modificări în distribuția maselor moleculare observate. Este indicat ca sistemul de pompare a solventului să fie lipsit de pulsații; este de preferat ca acesta să includă un amortizor de impulsuri. Debitul este de ordinul a 1 ml/min.

1.6.6. **Coloana**

În funcție de natura eșantionului testat, polimerul se caracterizează făcând recurs la o singură coloană sau la mai multe coloane, conectate în serie. În comerț, sunt disponibile mai multe materiale poroase pentru coloane, cu proprietăți definite (de exemplu, dimensiunea porilor, limita de excludere). Alegerea unui gel de separare sau a lungimii de coloană depinde, pe de o parte, de proprietățile eșantionului testat (volume hidrodinamice, distribuția maselor moleculare) și, pe de altă parte, de condițiile particulare ale separării, cum ar fi: natura solventului, temperatura și debitul (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Talere teoretice**

Coloana (sau combinația de coloane) utilizată pentru separare trebuie caracterizată prin numărul de talere teoretice. Pentru aceasta, în cazul în care solventul de eluare este THF, se trece o soluție de etilbenzen sau o altă substanță dizolvată nepolară potrivită, printr-o coloană de lungime cunoscută. Numărul de talere teoretice este dat de ecuația următoare:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{sau} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

unde:

N = numărul de talere teoretice

V_e = volumul de eluare, corespunzător semnalului maxim

W = lărgimea semnalului maxim, la nivelul liniei de bază

$W_{1/2}$ = lărgimea semnalului maxim, la jumătatea înălțimii coloanei

1.6.8. **Eficacitatea separării**

În afară de numărul de talere teoretice, parametru determinant al lărgimii de bandă, eficacitatea de separare este o altă caracteristică importantă, determinată de panta curbei de calibrare. Eficacitatea de separare a unei coloane se calculează cu ajutorul relației următoare:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secțiunea coloanei}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

unde:

$V_{e,\ M_x}$ = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară M_x;

$V_{e,(10.M_x)}$ = volumul de eluare al polistirenului cu masa moleculară de 10 ori mai mare

Rezoluția sistemului este în general definită după cum urmează:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

unde:

V_{e1}, V_{e2} = volumele de eluare ale celor doi polistireni standard la semnalul maxim

W_1, W_2 = lărgimile vârfului la nivelul liniei bazei

M_1, M_2 = masele moleculare corespunzătoare semnalului maxim (aceste mase ar trebui să fie diferite printr-un factor 10)

Valoarea lui R pentru sistemul de coloane trebuie să fie superioară valorii de 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solvenți**

Toți solvenții trebuie să aibă o mare puritate (se va folosi THF de puritate 99,5 %). Rezervorul pentru solvent (la nevoie, pus în atmosferă de gaz inert), trebuie să fie suficient de mare pentru a permite etalonarea coloanei și mai multe analize de eșantioane. Solventul va fi degazat înainte de a fi pompat în coloană.

1.6.10. **Reglarea temperaturii**

Temperatura componentelor interne critice (bucla de injecție, coloana sau coloanele, detectorul și tuburile) trebuie să fie constantă și compatibilă cu solventul ales.

1.6.11. **Detectorul**

Detectorul înregistrează în mod cantitativ concentrația eșantionului eluat din coloană. Pentru evitarea unei lărgimi nedorite a picului, volumul cuvei detectorului va fi ales cât mai mic posibil. Acesta nu trebuie să depășească 10 µl, cu excepția detectoarelor ce funcționează prin difuzia luminii și a viscozimetrelor. În general, detecția se realizează prin refractometrie diferențială. Totuși, dacă proprietățile specifice ale eșantionului sau ale solventului pentru eluare o cer, se pot folosi alte tipuri de detectoare, cum ar fi cele UV/VIS sau IR, viscozimetrele etc.

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Se va face referință la normele DIN (1) pentru ceea ce privește criteriile de evaluare detaliate, la fel pentru specificațiile relative la colectarea și interpretarea datelor.

Pentru fiecare eșantion analizat, se vor realiza două experiențe independente. Rezultatele acestora se vor analiza separat.

Trebuie indicat în mod explicit că valorile măsurate sunt valori relative corespunzând unor echivalenți de masă moleculară ale standardului folosit.

În toate cazurile, este esențial să se determine și datele relative la blancuri, acestea fiind tratate în același mod ca eșantioanele.

După determinarea volumelor și a timpilor de retenție (eventual corectate cu ajutorul unui standard intern) se vor reprezenta grafic valorile log M_p (M_p fiind semnalul maxim al polimerilor standard), în funcție de una dintre acele cantități. Sunt necesare cel puțin 2 puncte de etalonare pentru fiecare factor 10 de masă moleculară. Pentru trasarea întregii curbe sunt necesare cel puțin 5 puncte de măsură; această curbă va acoperi masa moleculară estimată a eșantionului. Punctul extrem al curbei de etalonare, spre partea maselor moleculare mici, se poate defini folosind n-hexilbenzenul sau altă substanță dizolvată nepolară adecvată. Se determină porțiunea de curbă corespunzătoare maselor moleculare mai mici de 1 000 și se va corecta, dacă va fi necesar, luând în considerare prezența impurităților și a aditivilor. În general, curbele de eluare sunt evaluate prin intermediul unui sistem de prelucrare informatică a datelor. Dacă s-a optat pentru o prelucrare manuală, este indicat să se consulte ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Dacă un polimer insolubil este reținut în coloană, masa sa moleculară este, foarte probabil, superioară celei corespunzătoare fracțiunii solubile și trebuie ținut cont de aceasta, pentru a evita subestimarea conținutului în polimeri de masă moleculară mică. În apendice se află indicațiile ce permit corecția conținutului în polimeri de masă moleculară mică, luând în considerare polimerii insolubili.

Curba de distribuție va fi prezentată sub forma unui tabel sau a unui grafic (frecvența diferențială sau procentajele cumulative în funcție de log M). În cazul reprezentării grafice, o putere de 10 pentru masa moleculară corespunde în mod normal unei lărgimi de aproximativ 4 cm, în vreme ce pentru maximul de semnal, este adecvată o înălțime de aproximativ 8 cm. În cazul curbelor de distribuție cumulative, diferența între 0 și 100 % pe axa ordonatei trebuie să fie în jur de 10 cm.

2.2. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare va cuprinde informațiile următoare:

2.2.1. **Substanța testată:**

— informații disponibile legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități);

— descrierea tratamentului aplicat eșantionului, observații, probleme.

2.2.2. **Dispozitivul experimental:**

— un rezervor pentru solvent, gaz inert, sistem pentru degazarea solventului, compoziția solventului, impurități;

— pompă, amortizor de impulsuri, sistem de injecție;

— coloane de separare (fabricant, toate precizările legate de caracteristicile coloanei, cum ar fi dimensiunea porilor, natura materialului de separare etc., numărul, lungimea și ordinul coloanelor utilizate);

— numărul de talere teoretice ale coloanei (sau al combinației de coloane), eficacitatea separării (resorbția sistemului);

— informații legate de simetria semnalelor maxime;

— temperatura coloanei, modul de reglare a temperaturii;

— detector (principiul de măsurare, tip, volumul cuvei);

— debitmetru, dacă există (fabricant, principiul de măsurare);

— sistemul utilizat pentru culegere și prelucrarea datelor (echipament și programe informatice).

2.2.3. **Etalonarea sistemului:**

— descrierea detaliată a metodei utilizate pentru determinarea curbei de etalonare;

▼B

— precizări asupra criteriilor de calitate proprii acestei metode (de exemplu, coeficientul de corelare, eroarea pătratică medie etc.);

— informații asupra tuturor extrapolărilor, ipotezelor și aproximărilor efectuate în cursul proceselor experimentale, precum și asupra evaluării și prelucrării datelor;

— toate măsurătorile efectuate pentru stabilirea curbei de etalonare trebuie prezentate sub forma unui tabel, care cuprinde, pentru fiecare punct de etalonare, următoarele informații:

  — denumirea eșantionului;

  — fabricantul eșantionului;

  — valorile caracteristice M_p, M_n, M_w, M_w/M_n ale etaloanelor furnizate de fabricant, deduse din măsurătorile ulterioare, completate de indicațiile legate de metoda de determinare;

  — volumul de injecție și concentrația substanței injectate;

  — valoarea de M_p utilizată pentru etalonare;

  — volumul de eluare sau timpul de retenție corectat, măsurat la semnalul maxim;

  — M_p calculat la semnalul maxim;

  — procentajul de eroare la M_p calculat și la valoarea de etalonare.

2.2.4. **Informații asupra conținutului în polimeri cu masă moleculară mică:**

— descrierea metodelor de analiză utilizate și a modului în care au fost conduse experimentele;

— informații privind procentajul conținutului în specii de masă moleculară mică (greutate/greutate) în raport cu ansamblul eșantionului;

— informații legate de impurități, aditivi și alte substanțe nepolimerice, în procentaj ponderal, funcție de ansamblul eșantionului;

2.2.5. **Evaluare:**

— evaluare în funcție de timp: toate metodele care vizează ameliorarea reproductivității cerute (metode de corecție, standard intern etc.);

— se precizează dacă evaluarea s-a efectuat plecând de la volumul de eluare sau de la timpul de retenție;

— se indică limitele de evaluare, dacă un pic nu a fost complet analizat;

— se descriu metodelor de netezire, dacă s-au folosit;

— se indică procedeele de preparare și pretratare a eșantionului;

— dacă există, se indică prezența particulelor nedizolvate;

▼B

— se indică volumul de injecție (µl) și concentrația de injecție (mg/ml);

— se menționează observațiile privind efectele generatoare de deviații, în raport cu profilul ideal de cromatografie pe gel permeabil;

— se descriu în detaliu toate modificările aduse procedurilor de analiză;

— se precizează intervalele de eroare;

— se consemnează orice alte informații și observații utile pentru interpretarea rezultatelor.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. DIN 55672 (1995), Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3. ASTM D 3536-91, (1991), Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992), Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apendice

Indicații care permit corecția conținutului de polimeri cu masă moleculară mică, luând în considerare polimerii insolubili

Prezența unui polimer insolubil într-un eșantion antrenează o pierdere de masă în cursul analizei cromatografice pe gel permeabil. Polimerul insolubil este ireversibil reținut în coloană sau în filtrul eșantionului, atunci când partea solubilă a eșantionului traversează coloana. Dacă indicele de refracție diferențial (dn/dc) al polimerului poate fi estimat sau măsurat, este posibilă estimarea masei pe care eșantionul a pierdut-o în coloană. În acest caz, se efectuează o corecție cu ajutorul unui etalonare extern al refractometrului, cu etaloane având concentrația și raportul dn/dc, cunoscute. În exemplul următor, s-a utilizat un etalon de poli(metacrilat de metil).

Etalonarea externă, practicată în timpul analizei polimerilor acrilici, constă în analizarea cu ajutorul metodei cromatografice pe gel permeabil, a unei soluții etalon de poli(metacrilat de metil) în tetrahidrofuran, cu concentrația cunoscută; rezultatele servesc la calcularea constantei refractometrului, conform ecuației următoare:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

unde:

K = constanta refractometrului (μV sec/ml)

R = răspunsul etalonului de polimetacrilat de metil (μV/sec)

C = concentrația etalonului de polimetacrilat de metil (mg/ml)

V = volumul de injecție (ml) și

dn/dc = indicele de refracție diferențial al unei soluții de polimetacrilat de metil în tetrahidrofuran (ml/mg)

Următoarele date caracterizează în general un etalon de polimetacrilat de metil:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Valoarea K rezultată, $3{,}05 \times 10^{11}$, este apoi utilizată pentru a calcula răspunsul teoretic al detectorului, adică ceea ce s-ar obține dacă 100 % din polimerul injectat s-ar alege la traversarea detectorului.

▼B

A.20. **COMPORTAMENTUL DE DIZOLVARE/EXTRACȚIE AL POLIMERILOR ÎN APĂ**

1. **METODĂ**

Metoda descrisă urmează Orientarea 120 (1997) a OCDE. Mai multe informații tehnice se găsesc în referințele bibliografice (1).

1.1. INTRODUCERE

În cazul anumitor polimeri, cum ar fi polimerii în emulsie, poate fi necesar un tratament inițial, înainte de utilizarea metodei expuse. Metoda nu este aplicabilă polimerilor lichizi, nici polimerilor care reacționează cu apa în condițiile experimentale.

Dacă este dificil sau imposibil să se pună în practică metoda, comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor poate fi studiat cu ajutorul altor metode. În acest caz, metoda utilizată va fi în întregime detaliată și justificată.

1.2. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.3. PRINCIPIUL METODEI

Comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor în mediu apos se determină prin metoda flaconului (a se vedea A.6 Solubilitatea în apă, metoda flaconului), căreia i se vor aduce modificările descrise mai jos.

1.4. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.5. DESCRIEREA METODEI

1.5.1. **Aparatură**

Aparatura necesară pentru aplicarea metodei este următoarea:

— un dispozitiv care permite măcinarea eșantionului până la obținerea unei pulberi, cum ar fi un concasor ce produce particule de dimensiuni determinate (1);

— un sistem de agitare, cu posibilitatea de reglare a temperaturii;

— un sistem de filtrare cu membrane;

— un dispozitiv de analiză;

— site standardizate.

1.5.2. **Prepararea soluției de eșantion**

Inițial trebuie măcinat un eșantion reprezentativ, până la dimensiuni ale particulelor cuprinse între 0,125 și 0,25 mm, utilizând sitele potrivite. Poate fi necesară o răcire pentru a garanta stabilitatea eșantionului sau pentru a se proceda la concasare. Materialele de tipul cauciucului pot fi pulverizate la temperatura azotului lichid (1).

Dacă nu este posibilă obținerea de particule la dimensiunile cerute, se vor reduce dimensiunile acestora cât mai mult posibil și se va consemna rezultatul. În cuprinsul raportului, este necesar să se indice modul în care eșantionul pulverizat a fost conservat înainte de analiză.

▼B

1.5.3. **Mod de operare**

Se cântăresc trei eşantioane din substanța testată, fiecare de 10 g, în trei recipiente prevăzute cu dop de sticlă şi se adaugă câte 1 000 ml apă în fiecare recipient. Dacă manipularea a 10 g de polimer se dovedeşte imposibilă, este indicat să se folosească cea mai mare cantitate care poate fi manipulată; volumul de apă va fi mărit în mod proporțional.

Recipientele se vor închide bine, apoi se vor agita la temperatura de 20 °C. Se va folosi un dispozitiv de agitare care funcționează la temperatură constantă. După 24 ore, conținutul fiecărui recipient este centrifugat sau filtrat, iar concentrația polimerului în faza apoasă limpede va fi determinată cu ajutorul unei metode potrivite de analiză. Dacă nu există o metodă adecvată, care să permită o analiză în faza apoasă, se poate obține o estimare a solubilității/extractibilității totale, prin cântărirea, după uscare, a reziduului filtrat sau a precipitatului centrifugat.

De asemenea, este necesară diferențierea cantitativă a impurităților şi aditivilor, pe de o parte, şi a speciilor de masă moleculară mică, pe de altă parte. În cazul unei determinări gravimetrice, este important să se realizeze o analiză inițială, fără substanță de testare, în scopul de a lua în considerare reziduurile generate prin metoda experimentală.

În mod similar, se poate determina comportamentul de dizolvare/extracție al polimerilor în apă, la 37 °C, pentru pH 2 şi pH 9, aşa cum a fost descrisă experiența realizată la 20 °C. Valorile pH-ului pot fi obținute prin adăugare de soluții tampon adecvate sau adăugare de acizi ori baze, potriviți; dintre aceştia, se pot enumera: acid clorhidric, acid acetic, hidroxizi de sodiu şi de potasiu de calitate analitică sau amoniac.

Trebuie realizate una sau două experiențe, conform metodei. În cazul în care sunt disponibile metode suficient de specifice, pentru analizarea directă a polimerului în faza apoasă, un experiment ca acela descris mai sus este destul. Însă, atunci când aceste metode nu există, iar determinarea comportamentului de dizolvare-extracție al polimerului, nu se poate face decât indirect – respectiv prin determinarea conținutului în carbon organic total (COT) al extractului apos – este necesară o experiență suplimentară. De asemenea, şi aceasta se va face în triplicat, cu eşantioane de polimer de 10 ori mai mici şi cu aceleaşi cantități de apă, ca şi la primul experiment.

1.5.4. **Analiza**

1.5.4.1. *Experimente realizate cu eşantioane de dimensiuni unice*

Este posibil să dispunem de metode care permit o analiză directă a polimerilor, în fază apoasă. În caz contrar, poate fi luată în considerare analiza indirectă a polimerilor dizolvați sau extraşi. Pentru aceasta, se va determina conținutul total în părți solubile, care se va corecta ținând cont de substanțele nepolimerice.

Pentru a determina conținutul total în specii polimerice, analiza extrasului apos se poate realiza:

fie printr-o metodă suficient de sensibilă, de exemplu:

— determinarea COT cu persulfat sau dicromat, pentru a se obține CO_2, urmată de o estimare prin IR sau de o analiză chimică;

▼B

— spectrometria de absorbție atomică (SAA) sau echivalentul acesteia, emisie în plasmă cuplată prin inducție (PCI);, în cazul polimerilor ce conțin siliciu sau un metal;

— absorbția UV sau spectrofluorimetria pentru polimerii arilici;

— cromatografia în fază lichidă cuplată cu spectrometria de masă, pentru eșantioane cu mase moleculare mici,

fie prin evaporare completă, în vid, a extrasului apos, urmată de o analiză a reziduului prin spectroscopie (IR, UV etc.) sau prin SAA-PCI.

Dacă o astfel de analiză a fazei apoase este imposibilă, extrasul apos se va obține cu ajutorul unui solvent organic nemiscibil în apă (o hidrocarbură clorurată, de exemplu). Apoi, solventul este evaporat și reziduul se analizează (prin IR, UV sau SAA-PCI), pentru determinarea conținutului său în polimer specificat. Toți constituenții acestui reziduu care se dovedesc a fi impurități sau aditivi trebuie separați, în scopul determinării gradului de dizolvare/extracție al polimerului.

Atunci când astfel de substanțe sunt prezente în cantități relativ importante, poate fi necesară supunerea reziduului unei analize cromatografice în fază lichidă, de înaltă performanță, sau în fază gazoasă, de exemplu, în scopul diferențierii acelor impurități prezente, de monomeri și derivați monomerici, astfel încât conținutul real în aceste ultime specii, să poată fi determinat.

În anumite cazuri, o simplă evaporare completă a solventului organic, urmată de cântărirea reziduului uscat, poate fi suficientă.

1.5.4.2. *Experimente realizate cu două eșantioane de mărimi diferite*

Conținutul în carbon organic total trebuie determinat pentru toate extrasele apoase.

Se realizează o determinare prin gravimetrie, asupra părții nedizolvate sau neextrase a eșantionului. Dacă, după centrifugarea sau filtrarea conținutului fiecărui recipient, reziduul de polimer aderă încă la peretele recipientului, trebuie clătit respectivul recipient cu filtratul, până când nu se mai observă urme de reziduu. După aceea, filtratul este refiltrat sau centrifugat. Reziduurile depuse pe filtru sau în tubul centrifugei sunt uscate la 40 ^{o}C, în vid, apoi se cântăresc. Se va continua uscarea, până la obținerea unei mase constante.

2. **DATE**

2.1. EXPERIMENTE REALIZATE CU EȘANTIOANE DE DIMENSIUNI UNICE

Rezultatele obținute pentru fiecare dintre cele trei flacoane, precum și valorile medii, trebuie consemnate și exprimate în unități de masă per volum de soluție (în general, în mg/l) sau în unități de masă per masă de eșantion de polimer (de obicei, în mg/g). În plus, pierderea de masă de eșantion (calculată prin raportarea masei soluției la masa inițială de eșantion), va fi de asemenea menționată. Trebuie calculate deviațiile standard relative. Diversele valori vor fi menționate o dată, pentru produsul total (polimer + principalii aditivi etc.) și repetate, pentru polimerul singur (pentru a cunoaște, după separare, mărimea relativă a respectivilor aditivi).

▼B

2.2. EXPERIMENTE REALIZATE CU EȘANTIOANE DE DIMENSIUNI DIFERITE

Diferitele concentrații ale carbonului organic total în extrasele apoase, provenite din cele două serii a câte trei experiențe, precum și valorile medii pentru fiecare serie, trebuie consemnate și exprimate în unități de masă per volum de soluție (în general, în mgC/l), precum și în unități de masă per masă de eșantion inițial (de obicei, în mgC/g).

Dacă nu există diferențe între rezultatele corespunzătoare rapoartelor dimensiune de eșantion/volum de apă mare sau mic, aceasta poate semnifica faptul că toți constituenții susceptibili a fi extrași, au fost efectiv extrași. În acest caz, o analiză directă nu este, de regulă, necesară.

Diferitele mase de reziduu trebuie consemnate și exprimate în procente de masă inițială de eșantion. Se vor calcula valori medii pentru fiecare experiență. Diferența dintre 100 și procentajul obținut, reprezintă procentul de materii solubile și extractibile din eșantioanele inițiale.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

3.1.1. **Substanța testată:**

— informații disponibile, legate de substanța testată (natură, aditivi, impurități, proporția speciilor cu masă moleculară mică).

3.1.2. **Condiții experimentale:**

— descrierea metodelor utilizate și a condițiilor experimentale;

— descrierea metodelor de analiză și detecție.

3.1.3. **Rezultate:**

— rezultate de solubilitate/extractibilitate în mg/l: toate valorile și valorile medii obținute pentru experiențele de extracție în diferite soluții, repartizate în polimeri și impurități, aditivi etc.;

— rezultate de solubilitate/extractibilitate în mg/g de polimer;

— concentrațiile carbonului organic total în extractele apoase, masa soluției și procentajele calculate, dacă s-a făcut măsurarea;

— pH-ul fiecărui eșantion;

— informații privind valorile obținute în experiențele martor (fără solvent);

— descrierea metodelor de analiză și detecție;

— dacă este necesar, se va menționa instabilitatea chimică a substanței testate, în cursul procedurii experimentale și în cursul analizei;

— toate informațiile importante pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. PROPRIETĂȚI OXIDANTE (LICHIDE)

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare este concepută pentru a măsura potențialul unei substanțe lichide de a crește rata sau intensitatea arderii unei substanțe combustibile sau de a forma cu o substanță combustibilă un amestec care se aprinde spontan când cele două se amestecă omogen. Se bazează pe testul ONU pentru lichide oxidante (1) și este echivalent cu acesta. Cu toate acestea, întrucât această metodă A.21 este concepută în special pentru a îndeplini cerințele Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, este necesară comparația cu o singură substanță de referință. Testarea și comparația cu alte substanțe de referință pot fi necesare în cazul în care se estimează utilizarea rezultatelor în alte scopuri ([1]).

Nu este necesar să se efectueze acest test în cazul în care examinarea formulei structurale stabilește indubitabil că substanța este incapabilă să reacționeze exotermic cu un material combustibil.

Înainte de efectuarea testului este util să se cunoască informații privind orice potențiale proprietăți explozive ale substanței.

Acest test nu se aplică substanțelor solide, gazoase, explozive sau foarte inflamabile sau peroxizilor organici.

Nu este necesar să se efectueze acest test în cazul în care sunt disponibile rezultatele pentru substanța de testat în cadrul testului ONU pentru lichide oxidante (1).

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Timpul mediu de creștere a presiunii reprezintă media timpilor măsurați în care un amestec testat produce o creștere de presiune de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică.

1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Ca substanță de referință se utilizează o soluție apoasă de acid azotic (calitate analitică) la 65 % (g/g) ([2]).

([1]) Ca de exemplu în cadrul reglementărilor privind transportul.
([2]) Înainte de testare, acidul trebuie titrat pentru a i se confirma concentrația.

▼B

Opțional, dacă experimentatorul prevede că rezultatele acestui test ar putea fi utilizate în alte scopuri, ar putea fi oportună testarea altor substanțe de referință ([1]).

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Lichidul care urmează a fi testat se amestecă, în proporție masică de 1 la 1 cu celuloză fibroasă și se introduce într-un vas de presiune. Dacă în timpul amestecării sau umplerii are loc combustia spontană, nu mai sunt necesare alte teste.

Dacă nu intervine combustia spontană, se efectuează testul complet. Amestecul se încălzește într-un vas de presiune și se măsoară timpul mediu de creștere a presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică. Acesta este comparat cu timpul mediu de creștere a presiunii pentru amestecul de substanță sau substanțe de referință și celuloză în proporție de 1:1.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Dintr-o serie de cinci teste asupra unei singure substanțe, rezultatele nu trebuie să prezinte diferențe de peste 30 % față de media aritmetică. Rezultatele care se abat cu peste 30 % de la medie se ignoră, se îmbunătățește procedura de amestecare și umplere și se repetă testele.

1.6. DESCRIEREA METODEI

1.6.1. **Pregătire**

1.6.1.1. *Substanța combustibilă*

Ca material combustibil se utilizează celuloză fibroasă uscată, cu fibre de o lungime între 50 și 250 μm și un diametru mediu de 25 μm ([2]). Celuloza se usucă până la obținerea unei greutăți constante în straturi de maximum 25 mm grosime, la 105 °C timp de patru ore, după care se păstrează într-un exsicator, în prezența unui deshidratant, până la răcire și utilizare. Conținutul de apă al celulozei uscate trebuie să fie sub 0,5 % din masa uscată ([3]). Dacă este necesar, timpul de uscare se prelungește pentru îndeplinirea acestei condiții ([4]). Pe întreg parcursul testului se utilizează același lot de celuloză.

([1]) De exemplu: acid percloric 50 % (g/g) și clorat de sodiu 40 % (g/g) se utilizează în referința 1.

([2]) De exemplu, pudră de celuloză Whatman pentru cromatografie pe coloană CF11, nr. de catalog 4021 050.

([3]) Confirmat prin (de exemplu) titrare Karl-Fisher.

([4]) Alternativ, acest conținut de apă poate fi realizat prin (de exemplu) încălzire la 105 °C sub vid, timp de 24 h.

▼B

1.6.1.2. *Aparatură*

1.6.1.2.1. Vas de presiune

Este necesar un vas de presiune. Vasul este format dintr-un vas de presiune cilindric, din oțel, cu o lungime de 89 mm și un diametru exterior de 60 mm (a se vedea figura 1). În două puncte diametral opuse se formează două suprafețe plane (care reduc secțiunea transversală a vasului la 50 mm) care permit fixarea sa în momentul instalării dopului de aprindere și a dopului de aerisire. Vasul, care are un alezaj cu un diametru de 20 mm, este fălțuit intern la ambele capete pe o adâncime de 19 mm și filetat pentru fileturi de 1" conform British Standard Pipe (BSP) sau echivalent metric. O priză de presiune, sub forma unui braț lateral, este înfiletată pe fața curbată a vasului de presiune la 35 de mm de unul dintre capete și la 90° față de suprafețele plane. Orificiul pentru priză este alezat la o adâncime de 12 mm și filetat pentru fileturi de 1/2" BSP (sau echivalent metric) la extremitatea brațului lateral. Dacă este necesar, pentru a asigura etanșeitatea la gaz, se folosește o garnitură inertă. Brațul lateral se extinde 55 mm de la corpul vasului de presiune și are un alezaj de 6 mm. Extremitatea brațului lateral este fălțuită și filetată pentru un traductor de presiune de tip diafragmă. Se poate utiliza orice dispozitiv de măsurare a presiunii care nu este afectat de gazele calde sau de produsele de descompunere și care poate reacționa la o creștere de presiune de la 690 la 2 070 kPa în cel mult 5 ms.

Extremitatea vasului de presiune cea mai îndepărtată de brațul lateral este închisă cu un dop de aprindere prevăzut cu doi electrozi, unul izolat de corpul dopului, iar celălalt pus la masă. Cealaltă extremitate a vasului de presiune este închisă cu un disc de rupere (presiunea de rupere aproximativ 2 200 kPa), fixat cu un dop de fixare având un orificiu de 20 mm. Dacă este necesar, dopul de aprindere se montează cu o garnitură inertă pentru a asigura etanșeitatea la gaz. În timpul utilizării, ansamblul este menținut în poziția corectă de un stand de sprijin (figura 2). Acesta cuprinde, de obicei, o placă de bază din oțel moale de 235 mm × 184 mm × 6 mm și un tub cu secțiune pătrată de 70 mm × 70 mm × 4 mm de 185 mm lungime.

La una dintre extremitățile tubului cu secțiune pătrată, se taie câte o secțiune de fiecare parte, astfel încât să se obțină o structură cu secțiune pătrată de 86 mm lungime cu două picioare plate. Capetele acestor picioare pătrate se taie într-un unghi de 60° față de orizontală și sudate pe placa de bază. Pe o parte a capătului superior al secțiunii de bază se decupează o fantă de 22 mm lățime și 46 mm adâncime, astfel încât, atunci când ansamblul vasului de presiune este pus pe suport, cu dopul de aprindere în jos, brațul lateral să intre în fantă. O piesă de oțel de 30 mm lățime și 6 mm grosime se sudează pe fața interioară a părții inferioare a tubului cu secțiune pătrată, pentru a acționa ca distanțier. Două șuruburi cu cap fluture de 7 mm, fixate pe partea opusă, mențin vasul de presiune într-o poziție fixă. Două benzi de 12 mm lățime din tablă de oțel de 6 mm grosime, sudate pe părțile laterale de la baza tubului cu secțiune pătrată, sprijină vasul de presiune de dedesubt.

▼B

1.6.1.2.2. Sistemul de aprindere

Sistemul de aprindere este format dintr-o sârmă de Ni/Cr cu o lungime de 25 cm, un diametru de 0,6 mm și o rezistență de 3,85 ohm/m. Sârma se înfășoară, pe o tijă cu un diametru de 5 mm, sub forma unei bobine, și se leagă la electrozii dopului de aprindere. Bobina trebuie să aibă una dintre configurațiile prezentate în figura 3. Distanța dintre fundul vasului și partea inferioară a bobinei de aprindere trebuie să fie de 20 mm. Dacă electrozii nu pot fi reglați, secțiunile sârmei de aprindere dintre bobină și fundul vasului se izolează cu o manta ceramică. Sârma este încălzită de o sursă de alimentare constantă care poate asigura cel puțin 10 A.

1.6.2. **Desfășurarea testului** ([1])

Aparatul, echipat complet cu traductor de presiune și sistem de încălzire, dar fără discul de rupere, se sprijină vertical, cu dopul de aprindere în jos. Se amestecă 2,5 g din lichidul de testat cu 2,5 g de celuloză uscată într-un pahar de laborator cu un agitator de sticlă ([2]). Pentru siguranță, în timpul amestecării între operator și amestec se amplasează un ecran de protecție. Dacă amestecul se aprinde în timpul amestecării sau umplerii, nu mai sunt necesare teste suplimentare. Amestecul se adaugă, în cantități mici, lovindu-l încet de container, în vasul de presiune, asigurându-se că nu există spații goale în jurul bobinei de aprindere și că amestecul este în contact perfect cu aceasta. Este important ca bobina să nu fie deformată în procesul de umplere, întrucât acest lucru ar putea conduce la rezultate eronate ([3]). Discul de rupere se pune pe poziție și dopul de fixare se înșurubează strâns. Vasul umplut se pune, cu discul de rupere în sus, pe suportul de sprijin pentru încălzire care se amplasează într-o hotă sau o cameră de tiraj adecvată. Se conectează sursa de alimentare la bornele externe ale dopului de aprindere și se aplică un curent de 10 A. De la începerea amestecării și până la punerea sub tensiune nu trebuie să treacă mai mult de 10 minute.

Semnalul produs de traductorul de presiune se înregistrează într-un sistem adecvat care permite atât evaluarea, cât și generarea unei înregistrări permanente a graficului presiune/timp obținut (de exemplu un înregistrator de semnale tranzitorii legat la un înregistrator cu bandă). Amestecul se încălzește până când se rupe discul de rupere sau cel puțin 60 s. Dacă discul de rupere nu se rupe, amestecul se lasă să se răcească, după care se dezmembrează cu atenție aparatul, luând măsurile necesare pentru a ține seama de eventuala presurizare. Se fac cinci teste cu substanța de testat și substanța sau substanțele de referință. Se notează timpul necesar pentru creșterea presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa peste presiunea atmosferică. Se calculează timpul mediu de creștere a presiunii.

În unele cazuri, substanțele pot genera o creștere de presiune (prea mare sau prea mică), cauzată de reacții chimice care nu caracterizează proprietățile oxidante ale substanței. În aceste cazuri, este posibil să fie necesară repetarea testului cu o substanță inertă, de exemplu diatomit (kieselgur), în loc de celuloză, pentru a se clarifica natura reacției.

([1]) Amestecurile de oxidanți cu celuloză trebuie tratate ca fiind potențial explozive și manipulate cu atenția cuvenită.

([2]) În practică, aceste lucru se poate realiza prin prepararea unui amestec 1:1 din lichidul de testat și celuloză, într-o cantitate mai mare decât cea necesară pentru test și mutând 5 ± 0,1 g în vasul de presiune. Amestecul trebuie să fie proaspăt preparat pentru fiecare testare.

([3]) Trebuie să se evite, în special, contactul dintre spirele adiacente ale bobinei.

▼B

2. **DATE**

Timpii de creștere a presiunii atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța (substanțele) de referință. Timpii de creștere a presiunii pentru testele cu o substanță inertă, dacă se efectuează astfel de teste.

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se calculează timpii medii de creștere a presiunii atât pentru substanța de testat, cât și pentru substanța sau substanțele de referință.

Se calculează timpul mediu de creștere a presiunii pentru testele cu o substanță inertă (dacă se efectuează).

Tabelul 1 prezintă câteva exemple de rezultate.

Tabelul 1

Exemple de rezultate [a]

Substanța [b]	Timpul mediu de creștere a presiunii pentru un amestec 1:1 cu celuloză (ms)
Dicromat de amoniu, soluție apoasă saturată	20 800
Nitrat de calciu, soluție apoasă saturată	6 700
Nitrat feric, soluție apoasă saturată	4 133
Perclorat de litiu, soluție apoasă saturată	1 686
Perclorat de magneziu, soluție apoasă saturată	777
Nitrat de nichel, soluție apoasă saturată	6 250
Acid azotic, 65 %	4 767 [c]
Acid percloric, 50 %	121 [c]
Acid percloric, 55 %	59
Nitrat de potasiu, soluție apoasă 30 %	26 690
Nitrat de argint, soluție apoasă saturată	[d]
Clorat de sodiu, soluție apoasă 40 %	2 555 [c]
Nitrat de sodiu, soluție apoasă 45 %	4 133
Substanță inertă	
Apă:celuloză	[d]

[a] A se vedea referința 1 pentru clasificarea conform regimului de transport ONU.
[b] Soluțiile saturate se prepară la 20 °C.
[c] Valoarea medie obținută la teste comparative interlaboratoare.
[d] Presiunea maximă de 2 070 kPa nu a fost atinsă.

▼B

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

— identitatea, puritatea, compoziția, puritatea etc. substanței de testat;

— concentrația substanței de testat;

— procedura de uscare a celulozei utilizate;

— conținutul de apă al celulozei utilizate;

— rezultatele măsurătorilor;

— rezultatele testelor cu o substanță inertă, dacă este cazul;

— timpii medii de creștere a presiunii calculați;

— orice abatere de la această metodă și motivele acesteia;

— orice informații și observații suplimentare relevante pentru interpretarea rezultatelor.

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR ([1])

Rezultatele testelor se evaluează în funcție de:

(a) eventuala combustie spontană a amestecului de substanță de testat și celuloză; și

(b) compararea timpului mediu necesar pentru creșterea presiunii de la 690 kPa la 2 070 kPa cu cel al substanței (substanțelor) de referință.

O substanță lichidă este considerată oxidant dacă:

(a) un amestec de substanță de testat și celuloză în proporție masică de 1:1 se aprinde spontan; sau

(b) un amestec de substanță de testat și celuloză în proporție masică de 1:1 are un timp mediu de creștere a presiunii mai mic sau egal cu cel al unui amestec de acid azotic în soluție apoasă de 65 % (g/g) și celuloză în proporție masică de 1:1.

Dacă este necesar pentru a evita un rezultat pozitiv fals, la interpretarea rezultatelor se iau în considerare și rezultatele obținute la testarea substanței cu un material inert.

([1]) A se vedea referința 1 pentru interpretarea rezultatelor conform reglementărilor ONU privind transportul utilizând mai multe substanțe de referință.

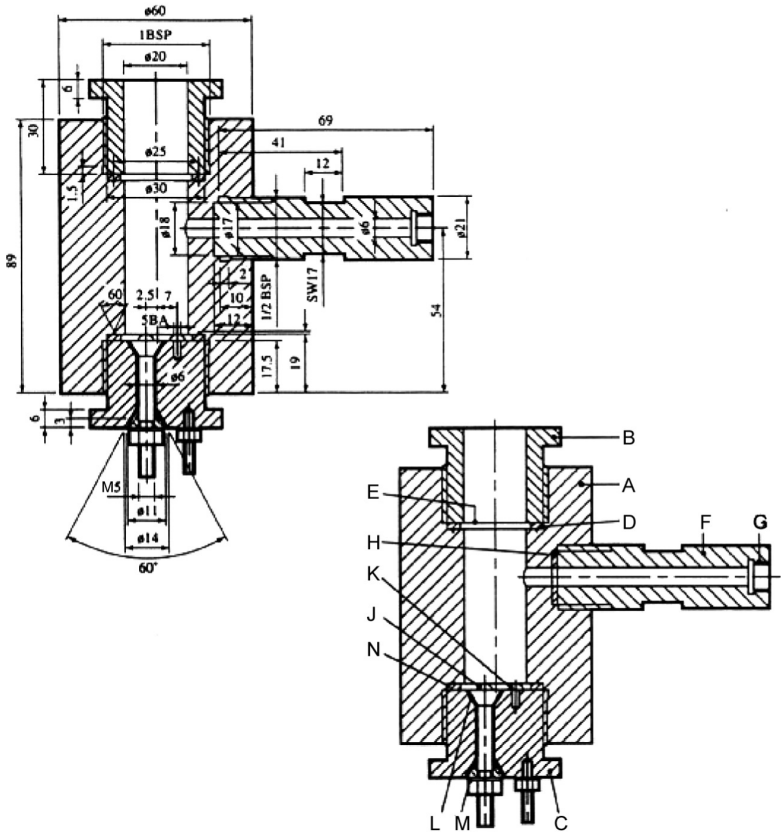
▼B

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

Figura 1

Vas de presiune

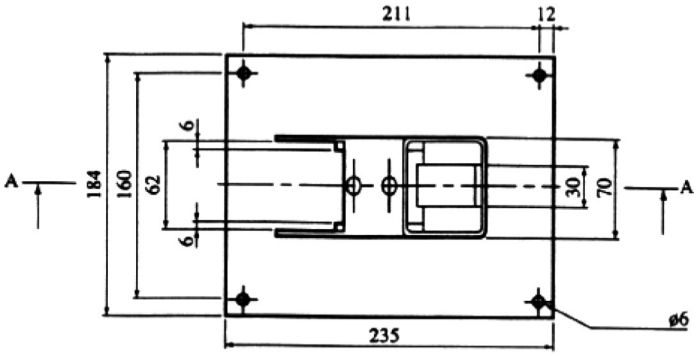


(A) Corpul vasului de presiune	(B) Dop de fixare disc de rupere	(C) Dop de aprindere
(D) Șaibă din plumb moale	(E) Disc de rupere	(F) Braț lateral
(G) Cap traductor de presiune	(H) Șaibă	(J) Electrod izolat
(K) Electrod pus la masă	(L) Izolație	(M) Con de oțel
(N) Canelură de deformare a șaibei		

▼B

Figura 2

Stand de sprijin



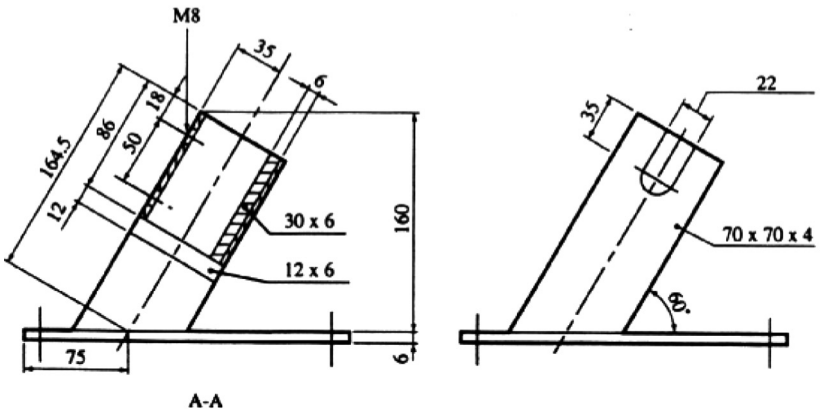
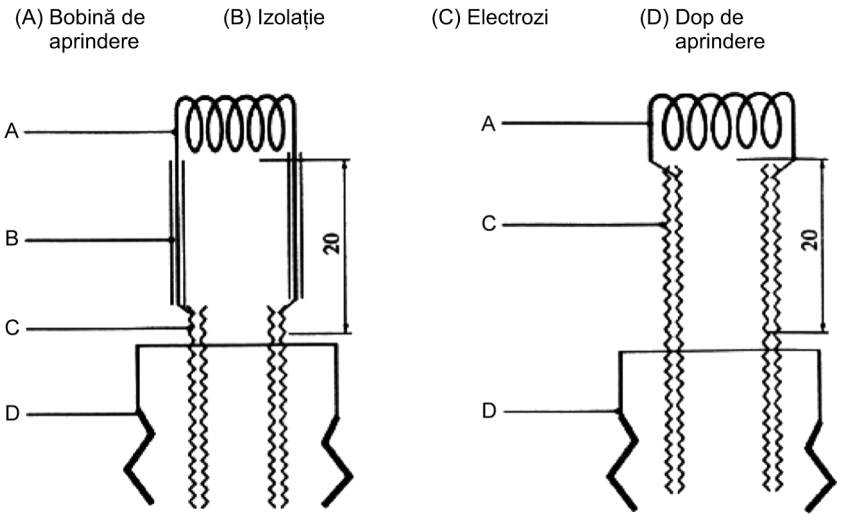


Figura 3

Sistemul de aprindere



Notă: se poate folosi oricare dintre aceste configurații.

▼M1

A.22. **DIAMETRU MEDIU GEOMETRIC PONDERAT PE LUNGIME AL FIBRELOR**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Această metodă descrie procedura de măsurare a diametrului mediu geometric ponderat pe lungime (LWGMD) al Fibrelor Minerale Artificiale (FMA) în vrac. În măsura în care LWGMD al populației are o probabilitate de 95 % de a fi cuprins între limitele de încredere la 95 % (LWGMD ± două erori standard) din eșantion, valoarea raportată (rezultatul testării) va fi limita de încredere inferioară procentului de 95 % din eșantion (adică LWGMD – 2 erori standard). Această metodă se bazează pe actualizarea (iunie 1994) unui proiect de procedură industrială a HSE asupra căruia s-a convenit cu ocazia unei reuniuni între ECFIA și HSE, care a avut loc la Chester la 26 septembrie 1993, și care a fost elaborat pentru și pe baza unui al doilea test interlaboratoare (1, 2). Această metodă de măsurare poate fi utilizată pentru a caracteriza diametrul fibrelor care intră în alcătuirea substanțelor sau a produselor în vrac ce conțin FMA-uri, inclusiv fibre ceramice refractare (FCR), fibre vitroase artificiale (FVA), fibre cristaline și policristaline.

Ponderarea pe lungime reprezintă o metodă de compensare a efectelor asupra distribuției diametrului cauzate de spargerea fibrelor lungi în timpul eșantionării sau manipulării materialului. Statistica geometrică (media geometrică) este utilizată pentru a măsura distribuția diametrelor FMA-urilor, având în vedere că distribuțiile acestor diametre sunt în general apropiate de distribuția log-normală.

Măsurarea lungimii și a diametrului este o operațiune fastidioasă și de durată, însă, dacă se măsoară doar acele fibre care intră în contact cu o linie infinit de subțire a câmpului vizual al unui MEB (microscop electronic cu baleiaj), atunci probabilitatea de a selecționa o fibră dată este proporțională cu lungimea sa. Având în vedere că această metodă ia în considerare lungimea la efectuarea calculelor de ponderare pe lungime, singura măsurătoare necesară este diametrul și LWGMD-2SE poate fi calculat conform descrierii.

1.2. DEFINIȚII

Particulă: Un obiect al cărui raport lungime/lățime este mai mic de 3:1.

Fibră: Un obiect al cărui raport lungime/lățime (raport de aspect) este de cel puțin 3:1.

1.3. DOMENIUL ȘI LIMITELE DE APLICARE

Metoda este concepută pentru a analiza distribuția diametrelor având un diametru mediu cuprins între 0,5 μm și 6 μm. Diametrele mai mari pot fi măsurate cu ajutorul unor grosismente inferioare ale MEB, însă această metodă va fi din ce în ce mai limitată, pe măsură ce distribuțiile fibrelor devin mai fine. În această situație, se recomandă efectuarea de măsurători cu ajutorul unui microscop electronic cu transmisie (MET), dacă diametrul mediu este mai mic de 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Un număr de eşantioane reprezentative sunt prelevate din fibre de ţesătură sau din fibre destrămate în vrac. Lungimea fibrelor în vrac este redusă printr-o procedură de zdrobire, apoi se dispersează în apă un subeşantion reprezentativ. Un număr de alicote sunt extrase şi filtrate cu ajutorul unui filtru din policarbonat cu un diametru al porilor de 0,2 μm, înainte de a fi pregătite spre examinare cu ajutorul tehnicilor de microscopie electronică cu baleiaj (MEB). Diametrele fibrelor sunt măsurate utilizându-se un grosisment al ecranului de cel puţin × 10 000 ([1]) cu ajutorul unei eşantionări liniare, astfel încât să se obţină o estimare imparţială a diametrului mediu. Intervalul de încredere mai mic de 95 % (bazat pe un test unilateral) se calculează pentru a obţine o estimare a valorii minime a diametrului mediu geometric al fibrelor materialului.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Siguranţă/precauţii**

Este necesar să se reducă la minimum expunerea personalului la fibre în suspensie în atmosferă, precum şi să se utilizeze o hotă sau o cutie cu mănuşi în timpul manipulării fibrelor. Trebuie efectuate controale periodice privind expunerea personalului, pentru a determina eficacitatea metodelor de control. În timpul manipulării FMA-urilor, personalul trebuie să poarte mănuşi de unică folosinţă pentru a reduce iritaţia pielii şi pentru a preveni contaminarea încrucişată.

1.5.2. **Aparatură/echipamente**

— Prese şi matriţe (capabile să producă 10 MPa).

— Filtre din policarbonat cu pori capilari de 0,2 μm (diametru de 25 mm).

— Filtru din membrană de ester de celuloză cu pori de 5 μm destinat utilizării ca filtru secundar.

— Aparat de filtrare din sticlă (sau sisteme de filtrare de unică folosinţă) concepute pentru filtre cu diametrul de 25 mm (de exemplu trusă de microanaliză din sticlă Millipore, tip nr. XX10 025 00).

— Apă proaspăt distilată şi filtrată cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,2 μm pentru îndepărtarea microorganismelor.

— Pulverizator catodic cu anticatod din aur sau din aur/paladiu.

— Microscop electronic cu baleiaj cu o rezoluţie capabilă să coboare până la 10 nm şi să funcţioneze la un grosisment de x 10 000.

— Diverse: spatule, lamă de scalpel de tip 24, pensete, tuburi MEB, adeziv sau bandă adezivă cu carbon, argint coloidal.

— Sondă cu ultrasunete sau baie de ultrasunete de laborator.

— Prelevator sau sondă, pentru prelevarea de eşantioane din ţesătura de FMA.

([1]) Această valoare de grosisment este indicată pentru fibrele de 3 μm. Pentru fibrele de 6 μm, un grosisment de × 5 000 poate fi mai potrivit.

▼M1

1.5.3. **Procedura de testare**

1.5.3.1. *Eșantionare*

Pentru țesături și plăci, se utilizează un prelevator sau o sondă de 25 mm pentru prelevarea de eșantioane din secțiunea transversală. Prelevările trebuie să fie efectuate la intervale identice pe toată lățimea unei mici lungimi din țesătură sau să fie colectate din zone aleatorii, dacă sunt disponibile lungimi mari ale țesăturii. Același echipament poate fi utilizat pentru a preleva eșantioane aleatorii din fibre destrămate. Dacă este posibil, trebuie prelevate șase eșantioane, pentru a reflecta variațiile spațiale din materialul în vrac.

Cele șase eșantioane trebuie zdrobite într-o matriță cu un diametru de 50 mm la 10 MPa. Materialul trebuie amestecat cu spatula și presat din nou la 10 MPa. Materialul este apoi îndepărtat din matriță și depozitat într-o sticlă închisă ermetic.

1.5.3.2. *Pregătirea eșantionului*

Dacă este necesar, lianții organici pot fi eliminați prin introducerea fibrei într-un cuptor la 450 °C timp de aproximativ o oră.

Se recomandă utilizarea conurilor pentru delimitare și împărțirea în sferturi pentru a subdivide eșantionul (această operațiune trebuie efectuată în interiorul unei incinte cu pulberi).

Cu ajutorul unei spatule, adăugați o cantitate mică (< 0,5 g) din eșantion în 100 ml de apă proaspăt distilată care a fost filtrată printr-un filtru cu membrană de 0,2 μm (pot fi utilizate și alte surse de apă ultra pură, cu condiția ca acestea să fie de o calitate satisfăcătoare). Dispersați atent cu ajutorul unei sonde cu ultrasunete care funcționează la 100 W și care este reglată pentru a produce cavitație. (Dacă nu dispuneți de o sondă, utilizați următoarea metodă: agitați și răsturnați de mai multe ori, timp de 30 de secunde; lansați ultrasunete într-o baie cu ultrasunete de laborator timp de cinci minute; apoi agitați și răsturnați de mai multe ori, timp de alte 30 de secunde.)

Imediat după dispersia fibrei, îndepărtați un anumit număr de alicote (de exemplu trei alicote de 3, 6 și 10 ml) utilizând o pipetă cu gură largă (cu o capacitate de 2-5 ml).

Filtrați sub vid fiecare alicotă cu ajutorul unui filtru din policarbonat de 0,2 μm susținut de un filtru secundar MEC cu pori de 5 μm, utilizând o pâlnie de filtrare din sticlă de 25 mm cu un rezervor clindric. O cantitate de aproximativ 5 ml de apă distilată filtrată trebuie introdusă în pâlnie, urmând ca alicota să fie pipetată încet în apă, menținând totodată vârful pipetei sub menisc. Pipeta și rezervorul trebuie clătite bine după pipetare, deoarece fibrele fine au tendința de a se localiza mai ales la suprafață.

Îndepărtați atent filtrul și separați-l de filtrul secundar înainte de a-l depune într-un recipient pentru a se usca.

▼M1

Decupați un sfert sau o jumătate din secțiunea de depozit filtrat cu o lamă de scalpel de tip 24 printr-o mișcare oscilatorie. Fixați atent secțiunea decupată pe placa unui MEB cu ajutorul unui bande adezive sau al unui adeziv cu carbon. Argintul coloidal trebuie aplicat în cel puțin trei poziții diferite pentru a îmbunătăți contactul electric la marginile filtrului și ale plăcii. După uscarea lipiciului/argintului coloidal, pulverizați catodic aproximativ 50 nm de aur sau de aur/paladiu pe suprafața depozitului.

1.5.3.3. *Calibrarea și funcționarea MEB*

1.5.3.3.1. Calibrarea

Calibrarea MEB trebuie verificată cel puțin o dată pe săptămână (la modul ideal o dată pe zi) cu ajutorul unei grile de calibrare omologată. Valorile de calibrare trebuie comparate cu o normă omologată și, în cazul în care valoarea măsurată (MEB) se situează în afara plajei de 2 % din valoarea omologată, calibrarea MEB trebuie ajustată și verificată din nou.

MEB trebuie să ofere cel puțin o rezoluție cu un diametru minim vizibil de 0,2 μm, utilizând o matrice de prelevare reală și un grosisment de × 2 000.

1.5.3.3.2. Funcționarea

MEB trebuie utilizat la un grosisment de 10 000 ([1]) în condiții care oferă o bună rezoluție și o imagine acceptabilă la viteze de baleiaj reduse de, spre exemplu, 5 secunde per cadru. Deși cerințele de funcționare ale diferitelor MEB-uri pot fi diferite, este necesar ca, în general, pentru a obține cea mai bună vizibilitate și rezoluție posibile cu materiale prezentând o masă atomică relativ scăzută, să se utilizeze tensiuni de accelerare între 5-10 keV cu o dimensiune redusă a spotului și o distanță mică de lucru. Având în vedere că se realizează o traversare liniară, este necesar să se utilizeze o inclinare de 0^{o} pentru a reduce la minimum refocalizarea sau, dacă MEB-ul prezintă o fază eucentrică, trebuie să se utilizeze distanța de lucru eucentrică. Un grosisment inferior poate fi utilizat dacă materialul nu conține fibre mici și dacă diametrele fibrelor sunt mari (> 5 μm).

1.5.3.4. *Dimensionare*

1.5.3.4.1. Examinare la un grosisment redus pentru a analiza eșantionul

Inițial, eșantionul trebuie examinat la un grosisment redus pentru a identifica existența unei aglutinări de fibre mari și pentru a determina densitatea fibrei. În cazul formării unei aglutinări excesive, se recomandă pregătirea unui nou eșantion.

Pentru a garanta acuratețea datelor statistice, este necesar să se măsoare un număr minim de fibre. O densitate mare a fibrelor poate părea de dorit, deoarece examinarea câmpurilor goale necesită timp și nu aduce nicio contribuție în ceea ce privește analiza. Cu toate acestea, dacă filtrul este supraîncărcat, măsurarea tuturor fibrelor măsurabile devine dificilă și, având în vedere că fibrele mici pot fi ascunse de altele mai mari, ele sunt susceptibile de a nu fi observate.

([1]) Pentru fibrele de 3 μm, a se vedea nota precedentă.

▼M1

O densitate superioară a fibrelor, de 150 de fibre per milimetru de traversare liniară, poate antrena o supraestimare a LWGMD. Pe de altă parte, concentrațiile reduse de fibre vor duce la creșterea timpului necesar efectuării analizei. Este adesea mai eficient din punctul de vedere al costurilor să se pregătească un eșantion cu o densitate a fibrei apropiată de valoarea optimală, decât să se insiste în ceea ce privește numărarea filtrelor cu concentrații reduse. Densitatea optimă de fibre trebuie să ofere o medie de aproximativ una sau două fibre numărabile per câmpuri vizuale la un grosisment de 5 000. Cu toate acestea, densitatea optimă va depinde de dimensiunea (diametrul) fibrelor, fiind așadar necesar ca operatorul să se bazeze pe experiența acumulată atunci când decide dacă densitatea fibrei este sau nu aproape de valoarea optimă.

1.5.3.4.2. Ponderarea pe lungime a diametrelor fibrelor

Numai fibrele care ating (sau intersectează) o linie (infinit) subțire trasată pe ecranul MEB sunt numărate. Din acest motiv, trebuie să se traseze o linie orizontală (sau verticală) de-a lungul centrului ecranului.

De asemenea, este posibil să se fixeze un punct unic în centrul ecranului și să se procedeze la un baleiaj continuu într-o singură direcție de-a lungul filtrului. Diametrul fiecărei fibre, al cărei raport de aspect depășește 3:1 și care atinge sau intersectează acest punct, trebuie măsurat și înregistrat.

1.5.3.4.3. Dimensionarea fibrei

Se recomandă măsurarea a minimum 300 de fibre. Fiecare fibră este măsurată o singură dată la punctul de intersectare cu linia sau punctul trasat pe imagine (sau în apropierea punctului de intersectare, dacă marginile fibrei sunt ascunse). Dacă este vorba de fibre care prezintă secțiuni transversale neuniforme, trebuie să se recurgă la o măsurătoare reprezentând diametrul mediu al fibrei. Trebuie să se acorde o atenție deosebită definirii marginii și măsurării distanței celei mai scurte dintre marginile fibrei. Dimensionarea se poate realiza on-line sau off-line, utilizându-se imagini sau fotografii stocate. Se recomandă utilizarea sistemelor semiautomate de măsurare a imaginii, care descarcă datele direct pe o foaie de calcul, deoarece acestea permit să se câștige timp, duc la eliminarea erorilor de transcriere și la automatizarea calculelor.

Extremitățile fibrelor lungi trebuie verificate la un grosisment redus, pentru a garanta că acestea nu revin în câmpul vizual în care se efectuează măsurătoarea și că sunt măsurate o singură dată.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

În general, diametrele fibrelor nu au o distribuție normală. Cu toate acestea, prin efectuarea unei transformări log, este posibilă obținerea unei distribuții apropiate de cea normală.

Calculați media aritmetică (lnD mediu) și deviația standard (DS_{lnD}) a logaritmului în raport cu valorile de bază (lnD) ale diametrelor celor n fibre (D).

$$\text{mediu lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \quad (1)$$

▼**M1**

$$DS_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mediu } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Deviația standard se împarte la rădăcina pătrată a numărului de măsurători (n) pentru a obține eroarea standard (ES_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{DS}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Scădeți de două ori eroarea standard din medie și calculați exponențiala acestei valori (media minus două erori standard) pentru a obține media geometrică minus două erori standard geometrice.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mediu } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPORTAREA**

RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

— Valoarea LWGMD-2ES.

— Toate deviațiile și, în special, cele care riscă să afecteze precizia sau acuratețea rezultatelor, precum și justificările pertinente.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive, February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive, Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

A.23. COEFICIENT DE PARTIȚIE (1-OCTANOL/APĂ): METODA AGITĂRII LENTE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 123 (2006) a OCDE. Valorile coeficientului de partiție 1-octanol/apă (P_{OW}) până la log P_{OW} de 8,2 au fost determinate cu precizie prin metoda agitării lente (1). Prin urmare, aceasta este o abordare experimentală adecvată pentru determinarea directă a P_{OW} al substanțelor puternic hidrofobe.

2. Alte metode pentru determinarea coeficientului de partiție 1-octanol/apă (P_{OW}) sunt metoda „agitării flaconului” (2) și determinarea P_{OW} din comportamentul de retenție HPLC (cromatografie lichidă de înaltă performanță) cu fază inversată (3). Metoda „agitării flaconului” este predispusă la artefacte din cauza transferului micro-picăturilor de octanol în faza apoasă. Odată cu creșterea valorilor P_{OW}, prezența acestor picături în faza apoasă duce la o supraestimare crescândă a concentrației substanței testate în apă. Prin urmare, utilizarea sa este limitată la substanțe cu log $P_{OW} < 4$. A doua metodă se bazează pe date solide privind valorile P_{OW} determinate direct, pentru calibrarea relației între comportamentul de retenție la HPLC (cromatografie lichidă de înaltă performanță) pentru calibrarea relației între comportamentul de retenție la HPLC și valorile măsurate ale P_{OW}. Un proiect de orientare OCDE a fost disponibil pentru determinarea coeficienților de partiție 1-octanol/apă ale substanțelor ionizabile (4), dar acesta nu mai trebuie să fie folosit.

3. Această metodă de testare a fost elaborată în Olanda. Precizia metodelor descrise aici a fost validată și optimizată într-un studiu de validare cu teste de comparare interlaboratoare la care au participat 15 laboratoare (5).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

Semnificație și utilizare

4. Pentru substanțe organice inerte s-au identificat relații foarte semnificative între coeficienții de partiție 1 octanol/apă (P_{OW}) și bioacumularea lor în pești. În plus, s-a demonstrat că P_{OW} este corelat cu toxicitatea pentru pești și cu absorbția substanțelor chimice în solide, cum sunt solurile și sedimentele. O privire de ansamblu extinsă a acestor relații a fost prezentată în referința bibliografică (6).

5. S-a stabilit o mare varietate de relații între coeficientul de partiție 1-octanol/apă și alte proprietăți ale substanței relevante pentru toxicologia și chimia mediului. În consecință, coeficientul de partiție 1-octanol/apă a devenit un parametru important în evaluarea riscului prezentat de substanțe chimice pentru mediu, precum și în estimarea evoluției substanțelor chimice în mediu.

Domeniu de aplicare

6. Experimentul cu agitare lentă este conceput pentru a reduce formarea micropicăturilor din picăturile de 1-octanol în faza apoasă. În consecință, nu intervine supraestimarea concentrației în fază apoasă din cauza moleculelor de substanță testată asociate cu aceste picături. Prin urmare, metoda amestecării lente este adecvată în special pentru determinarea P_{OW} la substanțe cu valori ale log P_{OW} cel puțin egale cu 5, pentru care metoda agitării flaconului (2) este predispusă să ducă la rezultate eronate.

▼M4

DEFINIȚIE ȘI UNITĂȚI

7. Coeficientul de partiție a unei substanțe între apă și un solvent lipofil (1-octanol) caracterizează distribuția la echilibru a substanței chimice între cele două faze. Coeficientul de partiție între apă și 1-octanol (P_{OW}) este definit ca raportul între concentrațiile la echilibru ale substanței testate în 1-octanol saturat cu apă (C_O) și apă saturată cu 1-octanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Ca raport de concentrații, P_{OW} este adimensional. Cel mai adesea este prezentat ca logaritm în baza 10 ($\log P_{OW}$). P_{OW} este dependent de temperatură, iar datele consemnate trebuie să includă temperatura de măsurare.

PRINCIPIUL METODEI

8. Pentru a determina coeficientul de partiție, apa, 1-octanolul și substanța testată sunt echilibrate între ele la temperatură constantă. Apoi se determină concentrațiile substanței testate în cele două faze.

9. Dificultățile experimentale asociate cu formarea de micro-picături în cursul experimentului cu agitarea flaconului se pot reduce prin experimentul cu agitație lentă, propus aici. În experimentul cu agitare lentă, apa, 1-octanolul și substanța testată sunt echilibrate într-un reactor termostatat cu amestecare. Schimbul între faze este accelerat prin agitare. Agitarea introduce o turbulență limitată, care îmbunătățește schimbul între 1-octanol și apă fără să se formeze micropicături (1).

APLICABILITATEA TESTULUI

10. Deoarece prezența altor substanțe în afara substanței testate ar putea influența coeficientul de activitate al substanței testate, substanța trebuie să fie testată în stare pură. Se folosește sortul disponibil comercial cu cea mai mare puritate pentru experimentul privind partiția 1-octanol/apă.

11. Prezenta metodă se aplică la substanțe pure care nu disociază și nu se asociază și care nu prezintă o activitate de interfață semnificativă. Ea se poate aplica pentru a determina raportul de partiție 1-octanol/apă pentru asemenea substanțe și pentru amestecuri. Când metoda este folosită pentru amestecuri, rapoartele de partiție 1-octanol/apă determinate sunt condiționale și depind de compoziția chimică a amestecului testat și de compoziția electrolitului folosit ca fază apoasă. Cu condiția executării unor etape suplimentare, metoda este aplicabilă și la compuși care disociază sau se asociază (punctul 12).

12. Din cauza echilibrelor multiple în apă și 1-octanol implicate în partiția 1-octanol/apă a substanțelor care disociază, de exemplu acizi organici și fenoli, baze organice și substanțe organometalice, raportul de partiție 1-octanol/apă este o constantă condițională care depinde mult de compoziția electrolitului (7) (8). Prin urmare, pentru determinarea raportului de partiție 1-octanol/apă este necesar ca pH-ul și compoziția electrolitului să fie controlate în cadrul experimentului și raportate. La evaluarea acestor rapoarte de partiție trebuie să se aplice o apreciere pe bază de experiență. Folosind valoarea constantei (constantelor) de disociere, trebuie să se aleagă valori adecvate ale pH-ului, astfel încât să se determine un raport de partiție pentru fiecare stare de ionizare. La testarea compușilor organometalici se folosesc soluții tampon care nu formează complecși (8). Luând în considerare cunoștințele existente privind chimia soluțiilor apoase (constante de complexare, constante de disociere), condițiile experimentale trebuie să fie alese astfel încât să se poată estima speciația substanței testate în faza apoasă. Forța ionică trebuie să fie identică în toate experimentele, prin utilizarea unui electrolit de fond.

▼M4

13. Dificultățile testării pot rezulta din efectuarea sa pentru substanțe cu solubilitate redusă în apă sau cu P_{OW} ridicat, deoarece concentrațiile în apă pot fi atât de reduse încât determinarea lor precisă este dificilă. Această metodă de testare prezintă recomandări pentru abordarea acestei probleme.

INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ

14. Reactivii chimici trebuie să fie de puritate analitică sau mai mare. Se recomandă utilizarea substanțelor de testare nemarcate, cu o compoziție cunoscută și, de preferință, cu o puritate minimă de 99 % sau a substanțelor de testare marcate radioactiv, cu compoziție și puritate radiochimică cunoscute. La indicatorii cu timpul de înjumătățire scurt trebuie să se aplice corecții de dezintegrare. În cazul substanțelor de testare marcate radioactiv, se folosește o metodă analitică specifică, pentru a asigura că radioactivitatea măsurată este legată direct de substanța testată.

15. O estimare a log P_{OW} se poate obține cu ajutorul unui software disponibil în comerț pentru estimarea log P_{OW} sau folosind raportul dintre solubilitățile în cei doi solvenți.

16. Înainte de efectuarea unui test cu agitare lentă pentru determinarea P_{OW}, trebuie să se cunoască următoarele informații privind substanța testată:

(a) formula structurală;

(b) metode analitice adecvate pentru determinarea concentrației substanței în apă și 1-octanol;

(c) constanta (constantele) de disociere a(le) substanțelor ionizabile [Orientarea 112 a OCDE (9)];

(d) solubilitatea în apă (10);

(e) hidroliza abiotică (11);

(f) biodegradabilitatea rapidă (12);

(g) presiunea de vapori (13).

DESCRIEREA METODEI

Aparatură și echipament

17. Este necesar echipament de laborator standard, care să cuprindă, în special, următoarele:

— agitatoare magnetice și baghete agitatoare acoperite cu teflon, pentru agitarea fazei apoase;

— instrumente analitice, adecvate pentru determinarea concentrării substanței testate în apă, la concentrațiile anticipate;

— vas de agitare cu robinet în partea inferioară. În funcție de estimarea log P_{OW} și a limitei de detecție (LOD) a compusului testat, trebuie luată în considerare utilizarea unui vas de reacție cu aceeași geometrie, cu capacitate mai mare de un litru, astfel încât să se poată asigura un volum de apă suficient pentru extracția și analiza chimică. Astfel se vor obține concentrații mai mari în extrasul apos și, implicit, determinarea analitică va fi mai credibilă. În apendicele 1 se prezintă un tabel cu estimări ale volumului minim necesar, valoarea LOD a compusului, valoarea estimată log P_{OW} și solubilitatea sa în apă. Tabelul se bazează pe relația între log P_{OW} și raportul între solubilitățile în octanol și apă, așa cum se prezintă de către Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

unde:

$SR = S_{oct}/S_w$ (ca molaritate);

și pe relația indicată de Lyman (15) pentru estimarea solubilității în apă. Solubilitățile în apă calculate cu ecuația din apendicele 1 trebuie considerate ca o primă estimare. Trebuie să se rețină faptul că utilizatorul este liber să estimeze solubilitatea în apă prin intermediul oricărei relații considerată ca reprezentând mai bine relația între caracterul hidrofob și solubilitate. Pentru compuși solizi, se recomandă, de exemplu, includerea punctului de topire în estimarea solubilității. În cazul în care se folosește o ecuație modificată, trebuie stabilit dacă mai este valabilă ecuația pentru calculul solubilității în octanol. În apendicele 2 se prezintă un desen schematic al unui vas de amestecare cu manta din sticlă cu volum de aproximativ 1 litru. Proporțiile vasului prezentat în apendicele 2 s-au dovedit favorabile și trebuie să fie menținute atunci când se utilizează un aparat de dimensiune diferită;

— este esențial un mijloc de menținere a temperaturii constante în timpul experimentului cu agitare lentă.

18. Vasele sunt confecționate dintr-un material inert, astfel încât adsorbția pe suprafețele vasului să fie neglijabilă.

Pregătirea soluțiilor de testare

19. Determinarea P_{OW} se face cu cel mai pur sortiment de 1-octanol disponibil în comerț (cel puțin + 99 %). Se recomandă purificarea 1-octanolului prin extracție cu acid, bază și apă și uscare ulterioară. În plus, se poate folosi distilarea pentru purificarea 1-octanolului. Pentru prepararea soluțiilor standard ale substanțelor testate se folosește 1-octanol purificat. Apa care se va folosi pentru determinarea P_{OW} este distilată în aparatură din sticlă sau sticlă de cuarț sau obținută dintr-un sistem de purificare sau se poate folosi apă de puritate HPLC. Este necesară filtrarea printr-un filtru de 0,22 μm pentru apa distilată și se includ probe-martor pentru a verifica dacă în extrasele concentrate nu există impurități care ar putea interfera cu substanța testată. În cazul în care se folosește un filtru din fibre de sticlă, el trebuie să fie curățat prin încălzire la 400 °C, timp de cel puțin trei ore.

20. Ambii solvenți sunt saturați reciproc înainte de experiment, prin echilibrarea lor într-un vas suficient de mare. Acest lucru se realizează prin agitarea lentă a sistemului bifazic timp de două zile.

21. Se alege o concentrație adecvată a substanței testate și se dizolvă în 1-octanol (saturat cu apă). Coeficientul de partiție 1-octanol/apă trebuie să fie determinat în soluții diluate în 1-octanol și apă. Prin urmare, concentrația substanței testate nu trebuie să depășească 70 % din solubilitatea sa, cu o concentrație maximă de 0,1 M în fiecare fază (1). Soluțiile în 1-octanol folosite pentru experiment trebuie să nu conțină particule solide în suspensie din substanța testată.

22. O cantitate adecvată de substanță testată se dizolvă în 1-octanol (saturat cu apă). În cazul în care valoarea estimată pentru log P_{OW} este mai mare de 5, trebuie avut grijă ca soluțiile de 1-octanol folosite pentru experiment să nu conțină particule solide în suspensie din substanța testată. În acest scop, pentru substanțe cu o valoare estimată a log $P_{OW} > 5$ se aplică următoarea procedură:

— se dizolvă substanța testată în 1-octanol (saturat cu apă);

▼M4

— se lasă soluția suficient timp pentru a permite sedimentarea particulelor solide în suspensie. În timpul perioadei de sedimentare, se monitorizează concentrația substanței testate;

— după ce concentrațiile măsurate în soluția 1-octanol au atins valori stabile, soluția stoc se diluează cu un volum adecvat de 1-octanol;

— se măsoară concentrația soluției stoc diluate. În cazul în care concentrația măsurată este în concordanță cu diluția, soluția stoc diluată se poate folosi în experimentul cu agitare lentă.

Extracția și analiza probelor

23. Pentru analiza substanței testate se folosește o metodă analitică validată. Investigatorii trebuie să prezinte dovezi că valorile concentrațiilor în 1-octanol saturat cu apă și în faza apoasă saturată cu 1-octanol în timpul experimentului sunt peste limita metodei de cuantificare a procedurilor analitice folosite. Recuperările analitice ale substanței testate din faza apoasă și faza de 1-octanol trebuie să fie stabilite înainte de experiment în acele cazuri pentru care sunt necesare metode de extracție. Semnalul analitic trebuie să fie corectat pentru probele-martor și trebuie să se evite antrenarea analitului de la o probă la alta.

24. Este probabil ca înainte de analiză să fie necesară extracția fazei apoase cu un solvent organic și preconcentrarea extrasului, din cauza concentrațiilor relativ scăzute de substanțe testate hidrofobe în faza apoasă. Din același motiv, este necesară reducerea concentrațiilor finale ale probelor-martor. În acest scop, trebuie să se folosească solvenți de mare puritate, preferabil solvenți pentru analiza reziduurilor. În plus, lucrul cu sticlărie curățată în prealabil cu atenție (de exemplu, prin spălare cu solvent sau încălzire la temperatură ridicată) poate contribui la evitarea contaminării încrucișate.

25. O valoare estimată a log P_{OW} se poate obține cu ajutorul unui program de estimare sau prin apreciere pe bază de experiență. În cazul în care valoarea este mai mare de 6, trebuie să se monitorizeze cu atenție corecțiile pe bază de probe-martor și antrenarea analitului. În mod similar, dacă estimarea log P_{OW} depășește valoarea 6, este obligatorie utilizarea unui standard surogat pentru corecția în funcție de recuperare, astfel încât să se poată atinge factori ridicați de preconcentrare. Pe piață sunt disponibile mai multe programe informatice pentru estimarea log P_{OW} ([1]), de exemplu Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) și ACD log P (19). Descrieri ale metodelor de estimare pot fi găsite în referințele bibliografice (20) (21) (22).

26. Limitele de cuantificare (LOQ) pentru determinarea substanței testate în 1-octanol și apă se stabilesc cu ajutorul unor metode acceptate. Ca regulă generală, limita de cuantificare a metodei se poate determina drept concentrația în apă sau 1-octanol care produce un raport de 10 între semnal și zgomot. Se alege o metodă adecvată de extracție și preconcentrare și trebuie să se specifice și recuperările analitice. Se alege un factor adecvat de preconcentrare, pentru a obține un semnal de dimensiunea necesară la determinarea analitică.

([1]) Această informație este prezentată doar pentru beneficiul utilizărilor. Se pot folosi alte programe informatice dacă se poate demonstra că generează aceleași rezultate.

▼M4

27. Pe baza parametrilor metodei analitice și a concentrațiilor anticipate, se determină o dimensiune aproximativă a probei, necesară pentru determinarea precisă a concentrației compusului. Trebuie să se evite utilizarea unor probe de apă care sunt prea mici pentru obținerea unui semnal analitic suficient. De asemenea, trebuie să se evite utilizarea unor probe de apă excesiv de mari, întrucât cantitatea de apă rămasă poate fi insuficientă pentru numărul minim de analize necesare (n = 5). În apendicele 1, volumul minim al probei este indicat în funcție de volumul vasului, LOD a substanței testate și solubilitatea substanței testate.

28. Cuantificarea substanțelor testate are loc prin compararea cu curbele de calibrare a compusului respectiv. Concentrațiile din probele analizate trebuie să fie încadrate de concentrațiile standardelor.

29. Pentru substanțe testate cu o valoare estimată a log P_{OW} peste 6, un surogat standard trebuie să fie adăugat în proba de apă înainte de extracție, pentru a înregistra pierderile produse în timpul extracției și preconcentrării probelor de apă. Pentru corecția precisă în funcție de recuperare, surogatele trebuie să aibă proprietăți foarte apropiate sau identice cu cele ale substanței testate. De preferință, se folosesc în acest scop analogi ai substanțelor de interes marcați cu izotopi (stabili), (de exemplu, izotopi cu atomii de hidrogen înlocuiți cu deuteriu sau marcați cu ^{13}C). În cazul în care nu este posibilă utilizarea de izotopi stabili, adică ^{13}C sau ^{2}H, trebuie să se demonstreze, pe baza unor date credibile din literatură, că proprietățile fizico-chimice ale surogatului sunt foarte apropiate de cele ale substanței testate. În timpul extracției lichid-lichid a fazei apoase, se pot forma emulsii. Ele pot fi reduse prin adăugare de sare și lăsarea emulsiei să se separe peste noapte. Trebuie să se consemneze metodele folosite pentru extracție și preconcentrarea probelor.

30. Dacă este necesar, probele extrase din faza 1-octanol pot fi diluate cu un solvent adecvat înainte de analiză. În plus, se recomandă ca standardele surogat pentru corecția în funcție de recuperare să fie utilizate pentru substanțe la care experimentele de recuperare au demonstrat un grad ridicat de variație în experimentele de recuperare (deviația standard relativă > 10 %).

31. Trebuie să se consemneze detaliile metodei analitice. Acestea includ metoda de extracție, preconcentrare și factorii de diluție, parametrii instrumentelor, procedura de calibrare, domeniul de calibrare, recuperarea analitică a substanței testate din apă, adăugarea de standarde surogat pentru corecția în funcție de recuperare, valorile probelor-martor, limitele de detecție și limitele de cuantificare.

Desfășurarea testului

Rapoarte optime 1-octanol/apă

32. La alegerea volumelor de apă și 1-octanol, se iau în considerare LOQ în 1-octanol și apă, factorii de preconcentrare aplicați probelor de apă, volumele prelevate în 1-octanol și apă și concentrațiile anticipate. Din motive experimentale, volumul de 1-octanol în sistemul cu agitare lentă se alege astfel încât stratul de 1-octanol să fie suficient de gros (> 0,5 cm) pentru a permite prelevarea din faza de 1-octanol fără a-l perturba.

33. Rapoartele tipice între faze folosite pentru determinările compușilor cu log P_{OW} de cel puțin 4,5 sunt 20 până la 50 ml de 1-octanol și 950 până la 980 ml apă într-un vas de un litru.

▼M4

Condițiile de testare

34. În timpul testului, vasul de reacție este termostatat pentru a reduce variația temperaturii sub 1 °C. Testul se efectuează la 25 °C.

35. Sistemul experimental este protejat față de lumina zilei, fie prin efectuarea experimentului într-o cameră obscură, fie prin acoperirea vasului de reacție cu folie de aluminiu.

36. Experimentul se realizează într-un mediu fără praf (pe cât posibil).

37. Sistemul 1-octanol-apă este agitat până ce se atinge echilibrul. Într-un experiment pilot, perioada de echilibrare este evaluată prin efectuarea unui experiment cu agitare lentă și prelevarea periodică de apă și 1-octanol. Prelevările se fac la intervale de minimum cinci ore.

38. Fiecare determinare a P_{OW} trebuie să se facă pe baza a minimum trei experimente independente cu agitare lentă.

Determinarea timpului de echilibrare

39. Se presupune că echilibrul este atins atunci când o regresie a raportului de concentrație 1-octanol/apă în funcție de timp pe o perioadă de patru intervale de timp generează o pantă care nu este semnificativ diferită de zero la un nivel al p de 0,05. Timpul minim de echilibrare este de o zi, înainte de a putea începe prelevarea. Ca regulă generală, prelevarea substanțelor cu o valoare estimată a log P_{OW} sub 5 poate avea loc în timpul celei de-a doua și celei de-a treia zile. Pentru compuși mai hidrofobi poate fi necesar să se prelungească echilibrarea. La un compus cu log P_{OW} de 8,23 (deca-clorbifenil) au fost suficiente 144 de ore pentru echilibrare. Echilibrul este evaluat prin intermediul prelevării repetate dintr-un singur vas.

Începerea experimentului

40. La începerea experimentului, vasul de reacție se umple cu apă saturată în 1-octanol. Se asigură suficient timp pentru a atingerea temperaturii termostatate.

41. În vasul de reacție se adaugă cu atenție cantitatea dorită de substanță chimică testată (dizolvată în volumul necesar de 1-octanol saturat cu apă). Aceasta este o etapă crucială a experimentului, deoarece trebuie să se evite amestecarea turbulentă a celor două faze. În acest scop, faza 1-octanol se poate pipeta lent pe peretele vasului de reacție, aproape de suprafața apei. Astfel, ea se va scurge de-a lungul peretelui de sticlă, formând o peliculă deasupra fazei apoase. Se evită întotdeauna turnarea directă a 1-octanolului în flacon; nu trebuie să se permită căderea picăturilor de 1-octanol direct în apă.

42. După începerea agitării, viteza de agitare este crescută lent. În cazul în care motoarele de agitare nu se pot regla corespunzător, se ia în considerare utilizarea unui transformator. Viteza de agitare este reglată astfel încât la interfața între apă și 1-octanol să se creeze un vârtej cu adâncimea de 0,5 până la maximum 2,5 cm. Viteza de agitare trebuie să fie redusă dacă adâncimea vârtejului depășește 2,5 cm; în caz contrar, se pot forma micropicături din picăturile de 1-octanol în faza apoasă, conducând la o supraestimare a concentrației substanței testate în apă. Viteza maximă de agitare cu vârtej de 2,5 cm este recomandată pe baza rezultatelor din studiul de validare cu teste de comparare interlaboratoare (5). Acesta este un compromis între atingerea unei rate de echilibrare rapide și limitarea formării de micropicături de 1-octanol.

▼M4

Prelevarea și tratarea probelor

43. Agitatorul trebuie să fie oprit înainte de prelevarea probelor și trebuie să se aștepte până ce mișcarea lichidelor a încetat. După încheierea prelevării, agitatorul se pornește din nou încet, așa cum se descrie mai sus, iar viteza de agitare este crescută treptat.

44. Faza apoasă este prelevată de la un robinet aflat în partea inferioară a vasului de reacție. Întotdeauna trebuie să se elimine volumul de apă stătută din robinete (aproximativ 5 ml la vasul prezentat în apendicele 2). Apa din robinete nu se agită, astfel încât nu este în echilibru cu volumul principal. Se notează volumul probelor de apă și se asigură că se ia în considerare cantitatea de substanță testată prezentă în apa eliminată, atunci când se stabilește un bilanț masic. Pierderile prin evaporare sunt minimizate lăsând apa să curgă lent în pâlnia de separare, astfel încât să nu se perturbe stratul de apă/1-octanol.

45. Probele de 1-octanol se obțin prin extragerea unei alicote mici (cca. 100 µl) din stratul de 1-octanol cu o seringă de 100 microlitri fabricată exclusiv din sticlă și metal. Trebuie să se evite perturbarea interfeței. Se înregistrează volumul de lichid prelevat. Este suficientă o alicotă mică, deoarece proba de 1-octanol va fi diluată.

46. Trebuie să se evite etapele inutile de transfer al probelor. În acest scop, volumul probei se determină gravimetric. În cazul probelor de apă, acesta lucru se poate realiza prin colectarea probei de apă într-o pâlnie separatoare care conține deja volumul necesar de solvent.

DATE ȘI RAPORT

47. În conformitate cu această metodă de testare, P_{OW} este determinat prin efectuarea a trei experimente cu agitare lentă (trei unități experimentale) în cadrul cărora compusul cercetat este supus unor condiții identice. Regresia folosită pentru a demonstra atingerea echilibrului se bazează pe rezultatele a minim patru determinări ale C_O/C_W la intervale de timp consecutive. Acest lucru permite calcularea variației ca măsură a incertitudinii valorii medii obținute din fiecare unitate experimentală.

48. P_{OW} poate fi caracterizat prin varianța datelor obținute din fiecare unitate experimentală. Această informație este folosită pentru a calcula P_{OW} ca medie ponderată a rezultatelor unităților experimentale individuale. Pentru aceasta, se folosește ca pondere inversul variației rezultatelor unităților experimentale. Drept urmare, datele cu o variație mai mare (exprimată ca varianță) și, astfel, cu grad de încredere mai mic, au mai puțină influență asupra rezultatului față de datele cu varianță redusă.

49. În mod analog, se calculează deviația standard ponderată. Ea caracterizează repetabilitatea măsurătorii P_{OW}. O valoare redusă a deviației standard ponderate indică faptul că determinarea P_{OW} a avut o repetabilitate foarte mare în cadrul unui laborator. În continuare se prezintă interpretarea statistică oficială a datelor.

▼M4

Interpretarea rezultatelor

Demonstrarea atingerii echilibrului

50. Logaritmul raportului între concentrația substanței testate în 1-octanol și apă [log (C_O/C_w)] este calculat pentru fiecare moment de prelevare a probelor. Atingerea echilibrului chimic este demonstrată prin reprezentarea grafică a acestui raport în funcție de timp. Un platou în acest grafic, care se bazează pe cel puțin patru momente consecutive, indică faptul că s-a atins echilibrul, iar compusul este dizolvat efectiv în 1-octanol. În caz contrar, trebuie să se continue testul până când patru momente succesive generează o pantă care nu este semnificativ diferită de 0 la un nivel p de 0,05, ceea ce indică faptul că log C_o/C_w este independent de timp.

Calcularea lui log P_{OW}

51. Valoarea lui log P_{OW} pentru unitatea experimentală se calculează ca valoarea medie ponderată a log C_o/C_w din porțiunea curbei log C_o/C_w în funcție de timp pentru care s-a demonstrat echilibrul. Media ponderată se calculează prin ponderarea datelor cu inversul variației, astfel încât influența datelor asupra rezultatului final este invers proporțională cu incertitudinea datelor.

Valoarea medie a log P_{OW}

52. Valoarea medie a log P_{OW} din diferite unități experimentale este calculată ca media rezultatelor unităților experimentale individuale ponderate cu variațele respective.

Calculul se face astfel:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

unde:

$\log P_{OW,i}$ = valoarea log P_{OW} a unității individuale experimentale i;

$\log P_{OW,Av}$ = valoarea medie ponderată a determinărilor individuale ale log P_{OW};

w_i = ponderea statistică atribuită valorii log P_{OW} a unității experimentale i;

Reciproca variației log $P_{OW,i}$ se folosește ca $w_i[w_i = \text{var } (\log P_{OW,i})^{-1}]$.

53. Eroarea valorii medii a log P_{OW} este estimată ca repetabilitatea log C_o/C_w determinată în timpul fazei de echilibru în unitățile experimentale individuale. Ea este exprimată ca deviația standard ponderată a log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) care, la rândul său, este o măsură a erorii asociate cu log $P_{OW,Av}$. Deviația standard ponderată se poate calcula din varianța ponderată ($var_{\log Pow,Av}$) astfel:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0.5}$$

Simbolul n reprezintă numărul de unități experimentale.

▼M4

Raportul de testare

54. Raportul de testare conține următoarele date:

Substanța testată:

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, structura chimică (indicându-se poziția marcării, atunci când se folosesc substanțe marcate radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea punctul 17);

— puritatea (impuritățile) substanței testate;

— puritatea de marcare pentru substanțele chimice marcate și activitatea molară (acolo unde este cazul);

— valoarea estimată preliminară a log P_{ow}, precum și metoda folosită pentru determinarea sa.

Condiții de testare:

— datele la care au fost realizate studiile;

— temperatura în timpul experimentului;

— volumele de 1-octanol și apă la începutul testului;

— volumele probelor de 1-octanol și apă extrase;

— volumele de 1-octanol și apă rămase în vasele de reacție;

— descrierea vaselor de reacție și a condițiilor de agitare (geometria agitatorului și a vasului de reacție, înălțimea vârtejului în mm și, acolo unde este disponibilă, viteza de agitare) folosite;

— metodele analitice folosite pentru a determina substanța de testare și limita de cuantificare a metodei;

— intervalele de prelevare a probelor;

— pH-ul fazei apoase și substanțele tampon folosite când pH-ul este reglat pentru molecule ionizabile;

— numărul de duplicate.

Rezultate:

— repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;

— concentrațiile determinate ale substanței testate în 1-octanol și apă ca funcție de timp;

— verificarea bilanțului masic;

— temperatura și deviația standard sau domeniul de temperatură în timpul experimentului;

— regresia raportului de concentrație în timp;

— valoarea medie a log $P_{ow,Av}$ și eroarea sa standard;

— discutarea și interpretarea rezultatelor;

▼M4

— exemple de date primare din analize reprezentative (toate datele primare trebuie păstrate în conformitate cu standardele GLP), inclusiv recuperări ale surogatelor și numărul de niveluri folosite în calibrare (împreună cu criteriile pentru coeficientul de corelație al curbei de calibrare) și rezultatele asigurării calității/controlului calității (QA/QC);

— în cazul în care este disponibil: raportul de validare a procedurii de testare (se va indica la referințele bibliografice).

BIBLIOGRAFIE:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989), Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Capitolul A.8 din prezenta anexă, „Coeficientul de partiție".

(3) Capitolul A.8 din prezenta anexă, „Coeficientul de partiție".

(4) OECD (2000), OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances, Paris.

(5) Tolls J. (2002), Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000), Handbook of property estimation methods for chemicals, Lewis Publishers Boca Raton, F.L., USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993), Environmental Organic Chemistry, Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997), Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition, *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water, Paris.

(10) Capitolul A.6 din prezenta anexă, „Solubilitatea în apă".

(11) Capitolul C.7 din prezenta anexă, „Degradarea – Degradarea abiotică: Hidroliza ca o funcție a pH-ului".

(12) Capitolul C.4 din prezenta anexă, părțile II-VII (metodele A-F) „Determinarea biodegradabilității «rapide»".

(13) Capitolul A.4 din prezenta anexă, „Presiunea de vapori".

(14) Pinsuwan S., Li A. and Yalkowsky S.H. (1995), Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman W.J. (1990), Solubility in water. În: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., Eds. American Chemical Society, Washington, D.C., de la 2-1 la 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989), Medchem Software Manual, Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993), SRC-LOGKOW for Windows, SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992), ProLogP, Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP, Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. În Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds., *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979), The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O. (1958), Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Apendicele 1

Foaie de calcul pentru calculul volumelor minime de apă necesare pentru detectarea substanțelor testate cu valori diferite ale log P_{OW} în faza apoasă

Ipoteze:

— volumul maxim al alicotelor individuale = 10 % din volumul total; 5 alicote = 50 % din volumul total;

— concentrația substanțelor testate = 0,7 × solubilitatea în fiecare fază. În cazul unor concentrații mai mici, sunt necesare volume mai mari;

— volumul folosit pentru determinarea LOD = 100 ml;

— log P_{ow} în funcție de log S_w și log P_{ow} în funcție de SR (S_{oct}/S_w) sunt reprezentări rezonabile ale relațiilor pentru substanțele testate.

Estimarea S_w

log P_{ow}	ecuație	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 3,192	6,427E-04

Estimarea S_{oct}

log P_{ow}	ecuație	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Masa totală a substanței testate (mg)	$Masa_{oct}/Masa_{apă}$	$Masa_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Masa_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calculul volumelor

Volum minim necesar pentru faza H_2O la fiecare concentrație LOD

log K_{ow}	LOD (micrograme/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volum folosit pentru LOD (l)	0,1					

Legendă pentru calcule

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 1 litru;

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 2 litri.

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 5 litri.

Reprezintă < 10 % din volumul total al fazei apoase, vas de echilibrare de 10 litri.

Depășește 10 % chiar și din vasul de echilibrare de 10 litri.

▼**M4**

Prezentare a volumelor necesare, ca funcție de solubilitate în apă și Log P_{ow}

Volum minim necesar pentru faza H_2O la fiecare concentrație LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgame/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

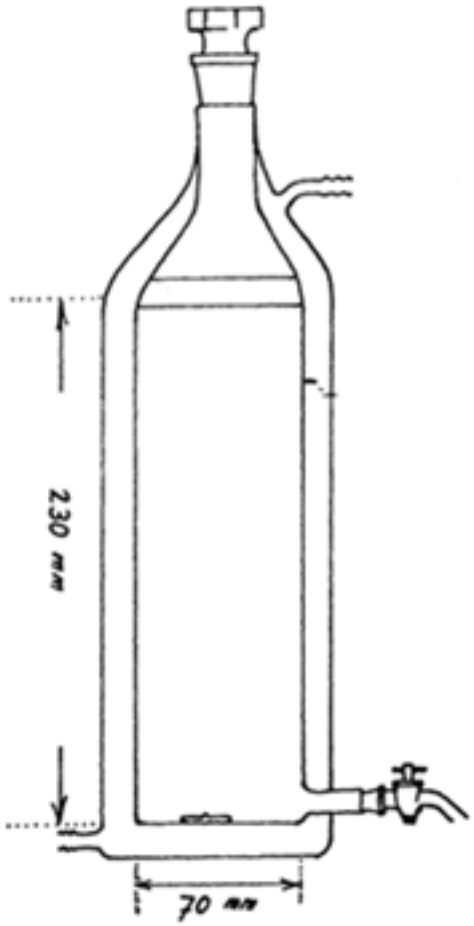
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volum folosit pentru LOD (I)		0,1					

▼M4

Apendicele 2

Exemplu de vas de testare cu manta din sticlă pentru experimentul cu agitare lentă, pentru determinarea P_{OW}



▼**M6**

A.24. COEFICIENTUL DE PARTIȚIE (N-OCTANOL/APĂ), METODA CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

INTRODUCERE

Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 117 (2004).

1. Coeficientul de partiție (P) se definește ca raportul dintre concentrațiile de echilibru ale unei substanțe dizolvate într-un sistem bifazic constând din doi solvenți aproape nemiscibili. În cazul n-octanol și apă,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{apă}}}$$

coeficientul de partiție fiind raportul dintre două concentrații, el este adimensional și de regulă este exprimat ca logaritm în baza 10.

2. P_{ow} reprezintă un parametru-cheie în studiile privind evoluția în mediu a substanțelor chimice. S-a dovedit existența unei relații foarte importante între P_{ow} al formei neionizate a substanțelor și bioacumularea lor în pești. S-a dovedit, de asemenea, că P_{ow} reprezintă un parametru util pentru estimarea adsorbției pe sol și sedimente și pentru stabilirea relațiilor structură-activitate cantitative pentru o gamă largă de efecte biologice.

3. Propunerea inițială privind această metodă de testare a avut la bază un articol scris de C.V. Eadsforth și P. Moser (1). Umweltbundesamt din Republica Federală Germania a coordonat în 1986 (2) dezvoltarea metodei de testare și o comparație interlaboratoare realizată de OCDE.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

4. Valorile log P_{ow} cuprinse între – 2 și 4 (ocazional până la 5 sau mai mult) ([1]) pot fi determinate în mod experimental prin metoda agitării flaconului (capitolul A.8 din prezenta anexă, Orientarea OCDE privind testarea nr. 107). Metoda HPLC acoperă log P_{ow} de la 0 până la 6 (1)(2)(3)(4)(5). Această metodă ar putea necesita o estimare a P_{ow} pentru a stabili substanțe de referință adecvate și pentru a susține concluziile trase din datele generate de test. Metodele de calcul sunt discutate succint în apendicele la această metodă de testare. Modul de operare HPLC este izocratic.

5. Valorile P_{ow} depind de condiții de mediu precum temperatura, pH-ul, tăria ionică etc., iar acestea trebuie definite în experiment în vederea interpretării corecte a datelor P_{ow}. Pentru substanțele ionizabile, ar putea deveni disponibilă și ar putea fi utilizată ca metodă alternativă o altă metodă [de exemplu proiectul de orientare OCDE privind metoda pH-metrică pentru substanțele ionizate (6)]. Deși acest proiect de orientare OCDE ar putea fi potrivit pentru determinarea P_{ow} pentru substanțele ionizabile, în anumite cazuri este mai adecvat să se utilizeze metoda HPLC la un nivel al pH-ului relevant din punctul de vedere al mediului (a se vedea punctul 9).

([1]) Necesitatea de a realiza o fază de separație completă după ajustările echilibrului partiției și înainte de extragerea eșantioanelor pentru determinările analitice impune o limită superioară. Dacă se acordă atenția necesară, limita superioară poate fi extinsă la valori mai ridicate ale P_{ow}.

▼M6

PRINCIPIUL METODEI

6. HPLC cu fază inversă se efectuează în coloane analitice umplute cu o fază solidă disponibilă în comerț care conține lanțuri lungi de hidrocarburi (de exemplu C_8, C_{18}) legate chimic pe silice.

7. O substanță chimică injectată într-o astfel de coloană separă faza mobilă cu solvent și faza staționară cu hidrocarburi în timp ce este transportată de-a lungul coloanei de faza mobilă. Substanțele sunt reținute proporțional cu coeficientul lor de partiție hidrocarbură/apă, mai întâi fiind eluate substanțele hidrofile și apoi substanțele lipofile. Timpul de retenție este descris de factorul de capacitate k rezultat din expresia:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

în care t_R este timpul de retenție al substanței de testare și t_0 este timpul mort, adică timpul mediu necesar unei molecule de solvent pentru a trece prin coloană. Nu sunt necesare metode analitice cantitative, ci doar determinarea timpilor de retenție.

8. Coeficientul de partiție octanol/apă al unei substanțe de testare poate fi calculat prin determinarea în mod experimental a factorului său de capacitate k și apoi introducerea k în următoarea ecuație:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

unde:

a, b = coeficienți de regresie liniară.

Ecuația de mai sus poate fi obținută prin regresia liniară a logaritmului coeficienților de partiție octanol/apă ai substanțelor de referință față de logaritmul factorilor de capacitate ai substanțelor de referință.

9. Metoda HPLC cu fază inversă permite estimarea coeficienților de partiție în intervalul log P_{ow} cuprins între 0 și 6, dar poate fi extinsă pentru a acoperi intervalul log P_{ow} cuprins între 6 și 10 în cazuri excepționale. Aceasta ar putea necesita modificarea fazei mobile (3). Metoda nu este aplicabilă acizilor și bazelor puternice, complecșilor metalici, substanțelor care reacționează cu eluentul sau agenților tensioactivi. Măsurătorile pot fi efectuate asupra substanțelor ionizabile în forma lor neionizată (acid liber sau bază liberă) numai utilizând o soluție tampon adecvată având un pH mai mic decât pK_a pentru un acid liber și mai mare decât pK_a pentru o bază liberă. În mod alternativ, metoda pH-metrică pentru testarea substanțelor ionizabile (6) ar putea deveni disponibilă și ar putea fi utilizată ca metodă alternativă (6). Dacă valoarea P_{ow} este determinată pentru a fi utilizată în clasificarea pericolelor pentru mediu sau în evaluarea riscurilor asupra mediului, testul ar trebui efectuat în intervalul de pH relevant pentru mediul natural, adică în intervalul de pH 5,0-9.

10. În unele cazuri, impuritățile pot face dificilă interpretarea rezultatelor din cauza incertitudinii atribuirii picurilor. Pentru amestecurile care au ca rezultat o bandă imprecisă, trebuie raportate limitele superioară și inferioară ale log P_{ow} și % de arie al fiecărui pic al log P_{ow}. Pentru amestecurile care reprezintă un grup de omologi, trebuie precizată și media ponderată a log P_{ow} (7), calculată pe baza valorilor P_{ow} unice și a valorilor % de arie corespunzătoare (8). Toate picurile care contribuie cu o arie de cel puțin 5 % la aria totală a picului trebuie luate în considerare pentru calcul (9):

▼M6

$$\textit{media ponderată } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\%\ \textit{de arie})}{\%\ \textit{din aria totală a picului}} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\%\ \textit{de arie}_i)}{\sum_i \%\ \textit{de arie}}$$

Media ponderată a log P_{ow} este valabilă numai pentru substanțele sau amestecurile (de exemplu uleiurile de tal) constând în omologi (de exemplu serii de alcani). Se pot obține rezultate relevante din măsurarea amestecurilor, cu condiția ca detectorul analitic utilizat să aibă aceeași sensibilitate față de toate substanțele din amestec și acestea să se poată dizolva în mod adecvat.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA DE TESTARE

11. Înainte de utilizarea metodei, trebuie să se cunoască constanta de disociere, formula structurală și solubilitatea în faza mobilă. În plus, ar fi utile informații despre hidroliză.

CRITERII DE CALITATE

12. Pentru a crește coeficientul de încredere al măsurătorilor, trebuie să fie făcute determinări duble.

— Repetabilitatea: valoarea log P_{ow} derivată din măsurătorile repetate efectuate în condiții identice și utilizând același set de substanțe de referință trebuie să fie în intervalul ± 0,1 unități logaritmice.

— Reproductibilitatea: Dacă măsurătorile se repetă cu un set diferit de substanțe de referință, rezultatele pot fi diferite. În mod tipic, coeficientul de corelație R pentru relația dintre log k și log P_{ow} pentru un set de substanțe de testare este în jur de 0,9, corespunzând unui coeficient de partiție octanol/apă de log P_{ow} ± 0,5 unități logaritmice.

13. Testul de comparație interlaboratoare a arătat că prin metoda HPLC valorile log P_{ow} pot fi obținute în intervalul de ± 0,5 unități față de valorile obținute prin metoda agitării flaconului (2). Alte comparații pot fi găsite în literatura de specialitate (4)(5)(10)(11)(12). Graficele de corelație bazate pe substanțe de referință înrudite structural oferă cele mai precise rezultate (13).

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

14. Pentru a corela factorul de capacitate k măsurat al unei substanțe cu P_{ow} al acesteia, trebuie creat un grafic de calibrare utilizând cel puțin 6 puncte (a se vedea punctul 24). Selectarea substanțelor de referință adecvate este la latitudinea utilizatorului. Substanțele de referință ar trebui să aibă în mod normal valori ale log P_{ow} care să cuprindă valoarea log P_{ow} a substanței de testare, adică cel puțin o substanță de referință ar trebui să aibă valoarea P_{ow} mai mare decât cea a substanței de testare, iar o altă substanță să aibă valoarea P_{ow} mai mică decât cea a substanței de testare. Extrapolarea ar trebui utilizată numai în cazuri excepționale. Este de preferat ca aceste substanțe de referință să fie înrudite structural cu substanța de testare. Valorile log P_{ow} ale substanțelor de referință utilizate pentru calibrare ar trebui să fie bazate pe date experimentale fiabile. Totuși, pentru substanțele cu log P_{ow} ridicat (în mod normal mai mare de 4), pot fi utilizate valorile calculate dacă nu sunt disponibile date experimentale fiabile. Dacă se utilizează valori extrapolate, ar trebui stabilită o valoare-limită.

15. Sunt disponibile liste lungi de valori log P_{ow} pentru multe grupe de substanțe chimice (14)(15). Dacă nu sunt disponibile date despre coeficienții de partiție ai substanțelor chimice înrudite structural, atunci poate fi folosită o calibrare mai generală, stabilită cu alte substanțe de referință. Substanțele de referință recomandate și valorile P_{ow} ale acestora sunt enumerate în tabelul 1. Pentru substanțele ionizabile, valorile date se aplică formei neionizate. Caracterul plauzibil și calitatea valorilor au fost verificate pe parcursul testului de comparație interlaboratoare.

▼**M6**

Tabelul 1

Substanțele de referință recomandate

	Numărul CAS	Substanța de referință	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanonă (metiletilcetonă)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridină	0,5	
3	62-53-3	anilină	0,9	
4	103-84-4	acetanilidă	1,0	
5	100-51-6	alcool benzilic	1,1	
6	150-76-5	4-metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	acid fenoxiacetic	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitril	1,6	
11	140-29-4	fenilacetonitril	1,6	
12	589-18-4	alcool 4-metilbenzilic	1,6	
13	98-86-2	acetofenonă	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	acid 3-nitrobenzoic	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-cloranilină	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzen	1,9	
18	104-54-1	alcool cinamilic (alcool cinamic)	1,9	
19	65-85-0	acid benzoic	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-crezol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	acid cinamic	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*,44 (trans)
22	100-66-3	anizol	2,1	
23	93-58-3	benzoat de metil	2,1	
24	71-43-2	benzen	2,1	
25	99-04-7	acid 3-metilbenzoic	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-clorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	tricloretilenă	2,4	
28	1912-24-9	atrazină	2,6	
29	93-89-0	benzoat de etil	2,6	

▼**M6**

	Numărul CAS	Substanța de referință	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diclorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	acid 3-clorobenzoic	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	toluen	2,7	
33	90-15-3	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dicloranilină	2,8	
35	108-90-7	clorbenzen	2,8	
36	1746-13-0	alil-fenileter	2,9	
37	108-86-1	brombenzen	3,0	
38	100-41-4	etilbenzen	3,2	
39	119-61-9	benzofenonă	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-diclorbenzen	3,4	
43	122-39-4	difenilamină	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	naftalină	3,6	
45	93-99-2	benzoat de fenil	3,6	
46	98-82-8	izopropilbenzen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triclorfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	bifenil	4,0	
49	120-51-4	benzoat de benzil	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-*sec*-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triclorbenzen	4,2	
52	143-07-7	acid dodecanoic	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	difenil eter	4,2	
54	85-01-8	fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzen	4,6	
56	103-29-7	dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenil-piridină	4,9	
58	206-44-0	fluoranten	5,1	
59	603-34-9	trifenilamină	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

DESCRIEREA METODEI

Estimarea preliminară a coeficientului de partiție

16. Dacă est necesar, coeficientul de partiție al substanței de testare poate fi estimat, de preferat, utilizând o metodă de calcul (a se vedea apendicele) sau, dacă este cazul, utilizând raportul de solubilitate al substanței de testare în solvenții puri.

Aparatură

17. Este necesar un cromatograf în fază lichidă prevăzut cu o pompă cu impulsuri slabe și cu un sistem de detecție potrivit. Pentru marea majoritate a grupelor de substanțe chimice se aplică un detector UV, utilizând o lungime de undă de 210 nm sau un detector RI. Prezența grupelor polare în faza staționară poate afecta serios performanțele coloanei HPLC. Prin urmare, fazele staționare ar trebui să aibă un procentaj minim de grupe polare (16). Pot fi folosite umpluturi de microparticule pentru inversarea fazelor din comerț sau coloane gata umplute. Între sistemul de injecție și coloana analitică poate fi poziționată o coloană de protecție.

Faza mobilă

18. Pentru a prepara solventul de eluție se folosește metanol de calitate HPLC și apă distilată sau deionizată, iar solventul este degazat înainte de folosire. Ar trebui utilizată eluție izocratică. Ar trebui utilizate rapoarte metanol/apă cu un conținut minim de apă de 25 %. În general, un amestec metanol-apă 3:1 (v/v) este satisfăcător pentru eluția substanțelor cu log P de 6 într-o oră, la un debit de 1 ml/min. Pentru substanțele cu log P mai mare de 6 poate fi necesar să se scurteze timpul de eluție (și cel al substanțelor de referință) prin reducerea polarității fazei mobile sau a lungimii coloanei.

19. Substanța de testare și substanțele de referință trebuie să fie solubile în faza mobilă într-o concentrație suficientă pentru a permite detectarea lor. Numai în cazuri excepționale pot fi folosiți aditivi împreună cu amestecul metanol-apă, deoarece aditivii vor schimba proprietățile coloanei. În aceste cazuri trebuie să se confirme că timpul de retenție al substanței de testare și al substanțelor de referință nu este influențat. Dacă amestecul metanol-apă nu este corespunzător, pot fi folosite alte amestecuri solvent organic-apă, de exemplu etanol-apă, acetonitril-apă sau alcool izopropilic (2-propanol)-apă.

20. PH-ul eluentului este un factor critic pentru substanțele ionizabile. Ar trebui să se încadreze în intervalul de pH operațional al coloanei, care este de obicei cuprins între 2 și 8. Se recomandă utilizarea unei soluții tampon. Trebuie să se acorde o atenție deosebită evitării precipitării sărurilor și deteriorării coloanei care au loc în cazul unor amestecuri fază organică/soluție tampon. Măsurătorile HPLC cu faze staționare pe bază de silice cu un pH mai mare de 8 nu sunt în mod normal recomandabile deoarece folosirea unei faze mobile alcaline poate cauza scăderea rapidă a performanțelor coloanei.

Soluții

21. Substanțele de testare și substanțele de referință trebuie să fie suficient de pure pentru a atribui picurile din cromatograme substanțelor corespunzătoare. Dacă este posibil, substanțele care sunt folosite în scopuri de testare sau calibrare se dizolvă în faza mobilă. Dacă se utilizează un alt solvent decât faza mobilă pentru a dizolva substanțele de testare și substanțele de referință, faza mobilă ar trebui utilizată pentru diluarea finală anterioară injecției.

Condițiile de testare

22. În timpul măsurătorilor, temperatura nu ar trebui să varieze cu mai mult de ± 1 °C.

▼M6

Determinarea timpului mort t_0

23. Timpul mort t_0 poate fi măsurat prin folosirea unor substanțe organice nereținute (de exemplu tioureea sau formamida). Un timp mort mai precis poate fi extras din timpii de retenție măsurați sau dintr-un set de aproximativ șapte membri ai unei serii omoloage (de exemplu n-alchil metil cetone) (17). Timpii de retenție t_R (n_C + 1) sunt reprezentați față de t_R (n_C), unde n_C este numărul de atomi de carbon. Se obține o linie dreaptă, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, unde A, care reprezintă k(n_C + 1)/k(n_C), este constant. Timpul mort t_0 se obține din intersecția dintre (1 – A)t_0 și panta A.

Ecuația de regresie

24. Următorul pas este reprezentarea grafică a unei corelații între log k și log P pentru substanțele de referință adecvate cu valori log P apropiate de valoarea așteptată pentru substanța de testare. În practică, se injectează simultan între 6 și 10 substanțe de referință. Timpii de retenție se determină, de preferat, cu un înregistrator conectat la sistemul de detecție. Logaritmii corespunzători ai factorilor de capacitate, log k, se reprezintă grafic ca funcție de log P. Ecuația de regresie se execută la intervale regulate, cel puțin o dată pe zi, astfel încât să se poată ține seama de posibilele schimbări ale performanțelor coloanei.

DETERMINAREA P_{OW} AL SUBSTANȚEI DE TESTARE

25. Substanța de testare se injectează în cele mai mici cantități detectabile. Timpul de retenție se determină în duplicat. Coeficientul de partiție al substanței de testare se obține prin interpolarea factorului de capacitate calculat pe graficul de calibrare. Pentru coeficienții de partiție foarte mici și pentru cei foarte mari este necesară extrapolarea. În special în aceste cazuri trebuie să se acorde atenție limitelor de încredere ale liniei de regresie. Dacă timpul de retenție al eșantionului este în afara intervalului de timpi de retenție obținut pentru etaloane, ar trebui stabilită o valoare-limită.

DATE ȘI RAPORT

Raportul de testare

26. În raport trebuie incluse următoarele informații:

— dacă s-a efectuat o estimare preliminară a coeficientului de partiție, valorile estimate și metoda utilizată; și dacă s-a utilizat o metodă de calcul, descrierea sa completă, inclusiv identificarea bazei de date și informații detaliate privind alegerea fragmentelor;

— substanțele de testare și substanțele de referință: puritatea, formula structurală și numărul CAS;

— descrierea echipamentelor și a condițiilor de operare: coloană analitică, coloană de protecție;

— faza mobilă, modalitatea de detectare, intervalul de temperatură, pH-ul;

— profilurile de eluție (cromatograme);

— timpul mort și modul în care a fost măsurat;

— datele privind retenția și valorile log P_{ow} din literatura de specialitate pentru substanțele de referință folosite în calibrare;

— detalii privind linia de regresie adaptată (log k în funcție de log P_{ow}) și coeficientul de corelație al liniei, inclusiv intervalele de încredere;

▼**M6**

— datele de retenție medii și valoarea interpolată log P_{ow} pentru substanța de testare;

— în cazul unui amestec: cromatograma profilului de eluție cu valorile-limită indicate;

— valorile log P_{ow} în raport cu % de arie al piculuі log P_{ow};

— calculul utilizând o linie de regresie;

— media ponderată a valorilor log P_{ow} calculate, dacă este cazul.

BIBLIOGRAFIE

(1) C.V. Eadsforth și P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss și H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt și R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OCDE (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez și C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke și K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem și K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs și C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky și A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa și E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch și A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony și J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Apendice

Metode de calcul al P_{ow}

INTRODUCERE

1. Prezentul apendice reprezintă o scurtă introducere privind calcularea P_{ow}. Pentru mai multe informații, cititorul trebuie să consulte manualele (1)(2).

2. Valorile calculate ale P_{ow} se utilizează pentru:

— a decide care metodă experimentală va fi utilizată: metoda agitării flaconului pentru log P_{ow} cuprins între – 2 și 4 și metoda HPLC pentru log P_{ow} cuprins între 0 și 6;

— a selecta condițiile care trebuie utilizate în HPLC (substanțe de referință, raportul metanol/apă);

— a verifica plauzibilitatea valorilor obținute prin intermediul metodelor experimentale;

— a obține o estimare atunci când metodele experimentale nu pot fi aplicate.

Principiul metodelor de calcul

3. Metodele de calcul sugerate aici se bazează pe fragmentarea teoretică a moleculei în substructuri adecvate pentru care se cunosc creșteri fiabile ale valorilor log P_{ow}. Log P_{ow} se obține prin însumarea valorilor corespunzătoare fragmentelor și a coeficienților de corecție pentru interacțiunile intramoleculare. Sunt disponibile liste ale constantelor fragmentelor moleculare și ale coeficienților de corecție (1)(2)(3)(4)(5)(6). Unele sunt actualizate cu regularitate (3).

Fiabilitatea valorilor calculate

4. În general, fiabilitatea metodelor de calcul scade cu cât complexitatea substanței studiate crește. În cazul moleculelor simple cu masă moleculară scăzută și una sau două grupe funcționale se pot aștepta abateri de la 0,1 până la 0,3 unități log P_{ow} între rezultatele diferitelor metode de fragmentare și valorile măsurate. Marja de eroare va depinde de fiabilitatea constantelor fragmentelor moleculare utilizate, de capacitatea de recunoaștere a interacțiunilor intramoleculare (de exemplu legături de hidrogen) și de utilizarea corectă a coeficienților de corecție. În cazul substanțelor ionizante trebuie luate în considerare sarcina și gradul de ionizare (10).

Metoda π Fujita-Hansch

5. Constanta substituentului hidrofob, π, introdusă inițial de Fujita et al. (7) se definește ca:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

unde PhX este un derivat aromatic iar PhH este substanța inițială.

$$\begin{aligned} \text{de exemplu}\quad ^{\pi}Cl &= \log Pow\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

Metoda π este de interes în principal pentru substanțele aromatice. Sunt disponibile valori π pentru un număr mare de substituenți (4)(5).

Metoda Rekker

6. Utilizând metoda Rekker (8), valoarea log P_{ow} se calculează astfel:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termeni de interacțiune})$$

▼M6

unde a_i reprezintă frecvența apariției unui anumit fragment în moleculă iar f_i reprezintă creșterea valorii log P_{ow} a fragmentului. Termenii de interacțiune pot fi exprimați ca multiplu întreg al unei singure constante C_m (așa numita „constantă magică"). Constantele fragmentelor f_i și C_m au fost determinate dintr-o listă de 1 054 de valori P_{ow} experimentale pentru 825 de substanțe utilizând analiza regresivă multiplă (6)(8). Determinarea termenilor de interacțiune se realizează conform normelor stabilite (6)(8)(9).

Metoda Hansch-Leo

7. Utilizând metoda Hansch și Leo (4), valoarea log P_{ow} se calculează astfel:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

unde f_i reprezintă o constantă de fragment molecular, F_j un coeficient (factor) de corecție, a_i și b_j frecvența corespunzătoare a apariției. Din valorile experimentale P_{ow} s-au extras, prin încercare și eroare, liste ale valorilor pentru fragmentele atomice și de grupă și ale coeficienților de corecție F_j. Coeficienții de corecție au fost împărțiți în mai multe clase distincte (1)(4). Pentru a ține cont de toate normele și coeficienții de corecție, s-au dezvoltat pachete software (3).

METODA COMBINATĂ

8. Calcularea log P_{ow} al moleculelor complexe poate fi considerabil îmbunătățită, dacă molecula este împărțită în substructuri mai mari, pentru care există valori log P_{ow} fiabile fie din tabele (3)(4), fie din măsurătorile existente. Astfel de fragmente (de exemplu heterociclurile, antrachinona, azobenzenul) pot fi apoi combinate cu valorile π Hansch sau cu constantele fragmentelor moleculare Rekker sau Leo.*Observații*

i) Metodele de calcul sunt aplicabile substanțelor ionizate parțial sau total numai atunci când se ține cont de factorii de corecție necesari.

ii) Dacă se presupune că există legături de hidrogen intramoleculare, trebuie adăugați coeficienții de corecție corespunzători (aproximativ + 0,6 până la + 1,0 unități log P_{ow}) (1). Indicații privind prezența unor astfel de legături pot fi obținute din modelele stereochimice sau din datele spectroscopice.

iii) Dacă sunt posibile mai multe forme tautomere, ar trebui folosită ca bază de calcul forma cea mai probabilă.

iv) Revizuirile listelor de constante ale fragmentelor moleculare ar trebui urmate cu atenție.

BIBLIOGRAFIE PRIVIND METODELE DE CALCUL

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther*. 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25. CONSTANTE DE DISOCIERE ÎN APĂ (METODA DE TITRARE – METODA SPECTROFOTOMETRICĂ – METODA CONDUCTOMETRICĂ)

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 112 (1981).

Premise

— Metodă analitică adecvată

— Solubilitate în apă

Informații orientative

— Formulă structurală

— Conductivitate electrică pentru metoda conductometrică

Declarații eligibile

— Toate metodele de testare pot fi efectuate pe substanțe pure sau la calitate din comerț. Se iau în considerare eventualele efectele ale impurităților asupra rezultatelor.

— Metoda de titrare nu este potrivită pentru substanțe cu solubilitate scăzută (a se vedea soluțiile de testare de mai jos).

— Metoda spectrofotometrică se aplică numai la substanțele care au spectre de absorbție UV/VIS diferite în mod semnificativ pentru formele disociate și nedisociate. Această metodă poate fi adecvată, de asemenea, pentru substanțele cu solubilitate scăzută și pentru disocieri non-acid/bază, de exemplu formarea de complecși.

— În cazul în care se aplică ecuația Onsager, metoda conductometrică poate fi utilizată inclusiv la concentrații relativ scăzute și chiar în cazurile de echilibre non-acid/bază.

Documente standard

Această metodă de testare se bazează pe metode indicate în referințele enumerate în secțiunea „Referințe bibliografice” și în documentul Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA, 18 august 1978.

METODA – INTRODUCERE, SCOP, DOMENIU DE APLICARE, RELEVANȚĂ, APLICARE ȘI LIMITE ALE TESTĂRII

Disocierea unei substanțe în apă este importantă pentru evaluarea impactului acesteia asupra mediului. Aceasta condiționează forma substanței care, la rândul său, determină comportamentul și transportul acesteia. Aceasta poate afecta adsorbția substanței chimice pe soluri și sedimente și absorbția în celule biologice.

Definiții și unități

Disocierea este divizarea reversibilă în două sau mai multe specii chimice care pot fi ionice. Procesul este indicat în general prin

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

iar constanta de echilibru a concentrației care reglementează reacția este

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

De exemplu, în cazul special în care R este hidrogen (substanța este un acid), constanta este

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

sau

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substanțe de referință

Următoarele substanțe de referință nu este necesar să fie folosite în toate cazurile în care se studiază o substanță nouă. Acestea sunt furnizate, în principal, pentru a permite calibrarea periodică a metodei și pentru a oferi posibilitatea comparării rezultatelor atunci când se aplică o altă metodă.

	pK_a ([1])	Temp. în °C
P-nitrofenol	7,15	25 ([1])
Acid benzoic	4,12	20
p-Cloranilină	3,93	20

([1]) Valoarea pentru 20 °C nu este disponibilă, dar se poate presupune că variabilitatea rezultatelor măsurării este mai mare decât dependența de temperatură preconizată

Ar fi util să se dispună de o substanță cu mai multe pK astfel cum se indică în secțiunea „Principiul metodei” de mai jos. O astfel de substanță ar putea fi:

Acid citric	pK_a (8)	Temp. în °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Principiul metodei de testare

Procesul chimic descris este în general doar în mică măsură dependent de temperatură, în intervalul de temperatură relevant din punct de vedere al mediului. Determinarea constantei de disociere necesită o măsură a concentrațiilor formelor disociate și nedisociate ale substanței chimice. Pe baza cunoștințelor privind stoichiometria reacției de disociere indicate mai sus în secțiunea „Definiții și unități”, poate fi determinată constanta adecvată. În cazul specific descris în prezenta metodă de testare, substanța se comportă ca un acid sau ca o bază, iar determinarea se efectuează cel mai convenabil prin stabilirea concentrațiilor relative ale formelor ionizate și neionizate ale substanței și a pH-ului soluției. Relația dintre acești termeni este redată în ecuația pentru pK_a în secțiunea „Definiții și unități” de mai sus. Unele substanțe prezintă mai mult de o constantă de disociere și ecuații similare pot fi dezvoltate. Unele dintre metodele descrise în prezenta anexă sunt adecvate, de asemenea, pentru disocierea non-acidă/bază.

Criterii de calitate

Repetabilitate

Constanta de disociere se reproduce (cel puțin trei determinări) cu o precizie de ± 0,1 unități logaritmice.

DESCRIEREA PROCEDURILOR DE TESTARE

Există două abordări principale pentru determinarea pK_a-ului. Una dintre acestea implică titrarea unei cantități cunoscute de substanță cu un acid sau o bază standard, după caz; cealaltă implică determinarea concentrației relative a formelor ionizate și neionizate și a dependenței acesteia de pH.

▼M7

Preparate

Metodele bazate pe principiile menționate pot fi clasificate ca proceduri de titrare, spectrofotometrice și conductometrice.

Soluții de testare

Pentru metoda de titrare și metoda conductometrică, substanța chimică se dizolvă în apă distilată. Pentru metoda spectrofotometrică și pentru alte metode, sunt utilizate soluții tampon. Concentrația substanței testate nu trebuie să depășească cea mai mică valoare dintre 0,01 M sau jumătate din concentrația de saturare, iar pentru crearea soluțiilor se utilizează cea mai pură formă disponibilă de substanță. În cazul în care substanța este greu solubilă, aceasta se poate dizolva într-o cantitate mică de solvent miscibil în apă înainte de a se adăuga la concentrațiile indicate mai sus.

Soluțiile se verifică pentru a detecta prezența emulsiilor cu ajutorul unui fascicul Tyndall, în special în cazul în care a fost utilizat un cosolvent pentru a crește solubilitatea. În cazul în care sunt utilizate soluții tampon, concentrația tampon nu trebuie să depășească 0,05 M.

Condițiile de testare

Temperatura

Temperatura se controlează la cel puțin ± 1 °C. Determinarea se efectuează de preferință la 20 °C.

În cazul în care se suspectează o dependență semnificativă de temperatură, determinarea se efectuează la cel puțin două alte temperaturi. În acest caz, intervalele de temperatură trebuie să fie de 10 °C, iar controlul temperaturii, de ± 0,1 °C.

Analize

Metoda va fi determinată de natura substanței testate. Aceasta trebuie să fie suficient de sensibilă pentru a permite determinarea diferitelor tipuri la fiecare concentrație de soluție testată.

Desfășurarea testării

Metoda de titrare

Soluția de testat se determină prin titrare cu o soluție standard bazică sau acidă, după caz, măsurând pH-ul după fiecare adăugare de soluție de titrare. Cel puțin 10 adăugări suplimentare trebuie efectuate până la punctul de echivalență. În cazul în care echilibrul este atins suficient de rapid, se poate utiliza un potențiometru cu înregistrare. Pentru această metodă, atât cantitatea totală de substanță, cât și concentrația acesteia trebuie să fie cunoscute cu exactitate. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a exclude dioxidul de carbon. Detaliile procedurii, măsurile de precauție, precum și metodele de calcul sunt prezentate în testări standard, de exemplu referințele bibliografice (1), (2), (3), (4).

Metoda spectrofotometrică

O lungime de undă este constatată în cazul în care formele ionizate și neionizate ale substanței au coeficienți de extincție diferiți în mod considerabil. Spectrul de absorbție UV/VIS se obține din soluții de concentrație constantă într-o condiție de pH în care substanța este în esență neionizată și pe deplin ionizată și la mai multe valori intermediare ale pH-ului. Acest lucru poate fi realizat fie prin adăugarea de acid concentrat (bază) la un volum relativ mare de soluție a substanței într-o soluție tampon cu mai multe componente, inițial cu valoare ridicată (scăzută) a pH-ului (referința 5) sau prin adăugarea de volume egale dintr-o soluție mamă de substanță în, de exemplu, apă, metanol, la volume constante de diferite soluții tampon care acoperă intervalul de pH dorit. Din valorile pH-ului și cele de absorbție la lungimea de undă aleasă, este calculat un număr suficient de valori de pK_a utilizând datele pentru minim 5 pH-uri în care substanța este ionizată cel puțin 10 procente și cel mult 90 de procente. Detalii experimentale suplimentare și metoda de calcul sunt prezentate în referința (1).

▼M7

Metoda conductometrică

Utilizând o celulă cu o constantă celulară mică, cunoscută, se măsoară nivelul de conductivitate al unei soluții de aproximativ 0,1 M de substanță de testat în apă de conductibilitate. De asemenea, se măsoară conductivitățile unei serii de diluții ale acestei soluții efectuate cu acuratețe. Concentrația este redusă la jumătate de fiecare dată, iar seria trebuie să acopere cel puțin un ordin de mărime al concentrației. Conductivitatea limită la diluție infinită se calculează prin efectuarea unui experiment similar cu sarea Na și prin extrapolare. Gradul de disociere poate fi calculat ulterior din conductivitatea fiecărei soluții cu ajutorul ecuației Onsage, prin urmare, utilizând legea diluției lui Ostwald, constanta de disociere poate fi calculată drept $K = \alpha^2C/(1 - \alpha$, unde C este concentrația în moli pe litru și α este gradul de disociere. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a exclude CO_2. Detalii experimentale suplimentare și metoda de calcul sunt indicate în texte standard și în referințele (1), (6) și (7).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Metoda de titrare

PK_a se calculează pentru 10 puncte măsurate pe curba de titrare. Se calculează valoarea medie și deviația standard pentru valorile pK_a respective. Se include un grafic al pH-ului în funcție de volumul de acid sau de bază standard, împreună cu o prezentare sub formă de tabel.

Metode spectrofotometrice

Valoarea absorbției și pH-ul pentru fiecare spectru sunt indicate în tabel. S unt calculate cel puțin cinci valori pK_a pornind de la puncte intermediare de date privind spectrele, iar valoarea medie și deviația standard pentru aceste rezultate sunt calculate, de asemenea.

Metoda conductometrică

Conductivitatea echivalentă Λ se calculează pentru fiecare concentrație de acid și pentru fiecare concentrație a unui amestec cu un echivalent de acid la care se adaugă 0,98 echivalent de hidroxid de sodiu fără carbonați. Acidul este în exces pentru a preveni un exces de OH^-datorat hidrolizei. 1/Λ este reprezentată în raport cu Ö_C, iar Λ_o a sării poate fi determinată prin extrapolare la concentrație zero.

Λ_o a acidului poate fi calculată utilizând valorile din literatura de specialitate pentru H^+ și Na^+. PK_a poate fi calculată din $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ și $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$pentru fiecare concentrație. Valori mai bune pentru K_a pot fi obținute prin efectuarea de corecții pentru mobilitate și activitate. Se calculează valoarea medie și deviația standard ale pK_a.

Raport de testare

Toate datele primare și valorile calculate pK_a trebuie prezentate împreună cu metoda de calcul (de preferință într-un format tabelar astfel cum se sugerează în referința 1), precum și parametrii statistici descriși mai sus. Pentru metodele de titrare, se prezintă detalii cu privire la standardizarea soluțiilor de titrare.

Pentru metoda spectrofotometrică, se prezintă toate spectrele. Pentru metoda conductometrică, se raportează detalii cu privire la determinarea constantei celulare. Se furnizează informații cu privire la tehnica utilizată, metodele de analiză și natura oricăror soluții tampon utilizate.

Se raportează temperatura (temperaturile) de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, p. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF [a se vedea mai sus (4)].

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

PARTEA B: METODE DE DETERMINARE A TOXICITĂȚII ȘI A ALTOR EFECTE ASUPRA SĂNĂTĂȚII

CUPRINS

INTRODUCERE GENERALĂ

B.1 bis. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – PROCEDURA CU DOZĂ FIXĂ

B.1 tris. TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ

B.2. TOXICITATEA ACUTĂ PRIN INHALARE

B.3. TOXICITATEA ACUTĂ (ADMINISTRARE CUTANATĂ)

B.4. IRITAȚIE/COROZIUNE CUTANATĂ ACUTĂ

B.5. COROZIUNE/IRITAȚIE OCULARĂ ACUTĂ

B.6. SENSIBILIZARE CUTANATĂ

B.7. STUDIU DE 28 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE

B.8. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 28 DE ZILE

B.9. TOXICITATE LA DOZĂ REPETATĂ (28 DE ZILE) (ADMINISTRARE CUTANATĂ)

B.10. TESTUL *IN VITRO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE CELULE DE MAMIFERE

B.11. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ ÎN MĂDUVA OSOASĂ DE MAMIFERE

B.12. TESTUL DE MICRONUCLEU PE ERITROCITE DE MAMIFERE

B.13/14. MUTAGENITATEA – TESTUL DE MUTAȚIE INVERSĂ PE BACTERII

B.17. TESTE *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE FOLOSIND GENELE HPRT ȘI XPRT

B.21. TEST *IN VITRO* DE TRANSFORMARE A CELULELOR DE MAMIFERE

B.22. TESTUL DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE

▼B

B.23.	TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE
B.25.	TRANSLOCAȚII EREDITARE LA ȘOARECI
B.26.	TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ. STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE
B.27.	TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ. STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA NEROZĂTOARE
B. 28	STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ – ADMINISTRARE CUTANATĂ. EXPERIMENT EFECTUAT TIMP DE 90 DE ZILE ASUPRA UNOR ROZĂTOARE
B.29	TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 90 DE ZILE
B.30	STUDII DE TOXICITATE CRONICĂ
B.31.	STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII INTRAUTERINE
B.32	STUDII DE CARCINOGENITATE
B.33	STUDII COMBINATE DE TOXICITATE CRONICĂ ȘI DE CARCINOGENITATE
B.34.	STUDIU DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA O GENERAȚIE
B.35.	STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA A DOUĂ GENERAȚII
B.36.	TOXICOCINETICĂ
B.37.	NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE DUPĂ EXPUNERE ACUTĂ
B.38.	NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE – STUDIU CU ADMINISTRARE ÎN MOD REPETAT PE O DURATĂ DE 28 DE ZILE
B.39.	TEST *IN VIVO* DE SINTEZĂ NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS) PE CELULE HEPATICE DE MAMIFERE
B.40.	COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODA DE TESTARE PRIVIND REZISTENȚA ELECTRICĂ TRANSCUTANATĂ (RET)
B.40 BIS.	COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ (RhE)
B.41.	TESTUL DE FOTOTOXICITATE 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42.	SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONII LIMFATICI

▼B

B.43. STUDII DE NEUROTOXICITATE PE ROZĂTOARE

B.44. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA *IN VIVO*

B.45. ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA DE TESTARE *IN VITRO*

B.46. IRITAȚIA CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ

B.47. METODA DE TESTARE A OPACITĂȚII ȘI PERMEABILITĂȚII CORNEENE LA BOVINE PENTRU IDENTIFICAREA I) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PRODUC LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A II) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ

B.48. METODA DE TESTARE A OCHIULUI IZOLAT DE PUI PENTRU IDENTIFICAREA I) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PROVOACĂ LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A II) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ

B.49. TESTUL *IN VITRO* DE MICRONUCLEU PE CELULE DE MAMIFERE

B.50. TESTUL *IN VITRO* DE MICRONUCLEU PE CELULE DE MAMIFERE

B.51. SENSIBILIZARE DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: BrdU-ELISA

B.52. TOXICITATE ACUTĂ PRIN INHALARE – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ

B.53. STUDIU DE NEUROTOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII

B.54. BIOTESTUL UTEROTROFIC LA ROZĂTOARE: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI ESTROGENICE

B.55. BIOTESTUL HERSHBERGER LA ȘOBOLANI: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI (ANTI)ANDROGENICE

B.56. STUDIU EXTINS DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE O GENERAȚIE

B.57. TESTUL DE STEROIDOGENEZĂ A H295R

B.58. TESTE DE MUTAȚIE GENETICĂ PRIVIND CELULELE GERMINALE ȘI SOMATICE LA ROZĂTOARE TRANSGENICE

B.59. SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN CHEMICO*: TESTUL REACTIVITĂȚII DIRECTE A PEPTIDELOR (DPRA)

B.60. SENSIBILIZARE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODA DE TESTARE A ERA-NRF2 ALE LUCIFERAZEI

B.61. METODA DE TESTARE A SCURGERII DE FLUORESCEINĂ PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV ȘI UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR

B.62. TESTUL COMET IN VIVO PE CELULE ALCALINE DE MAMIFERE

▼**B**

B.63. TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE

B.64. STUDIU DE TOXICITATE CU DOZĂ REPETATĂ COMBINAT CU TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE

B.65. METODA DE TESTARE *IN VITRO* PRIN BARIERĂ CU MEMBRANĂ PENTRU COROZIUNEA CUTANATĂ

B.66. TESTE *IN VITRO* DE TRANSACTIVARE CU TRANSFECTARE STABILĂ PENTRU DETECTAREA AGONIȘTILOR ȘI ANTAGONIȘTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

B.67. TESTE *IN VITRO* DE TRANSACTIVARE CU TRANSFECTARE STABILĂ PENTRU DETECTAREA AGONIȘTILOR ȘI ANTAGONIȘTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

B.68. METODĂ DE TESTARE IN VITRO PRIN EXPUNERE PE TERMEN SCURT PENTRU IDENTIFICAREA i) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PRODUC LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A ii) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂI

B.69. METODA DE TESTARE PE EPITELIU SIMILAR CORNEEI UMANE RECONSTRUIT (RhCE) PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ

B.70. ANALIZE *IN VITRO* CU RECEPTOR DE ESTROGEN RECOMBINANT UMAN (hrER) PENTRU DETECTAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CU AFINITATE DE LEGARE DE ER

B.71. TESTELE *IN VITRO* PRIVIND SENSIBILIZAREA CUTANATĂ, CARE ABORDEAZĂ EVENIMENTUL IMPORTANT PRIVIND ACTIVAREA CELULELOR DENDRITICE ASUPRA PARCURSULUI RĂSPUNSURILOR ADVERSE (ADVERSE OUTCOME PATHWAY - AOP) PENTRU SENSIBILIZAREA CUTANATĂ

▼B

INTRODUCERE GENERALĂ

A. **CARACTERIZAREA SUBSTANȚEI ANALIZATE**

Înainte de începerea oricărui studiu de toxicitate, trebuie să fie cunoscute compoziția substanței, inclusiv principalele sale impurități, proprietățile sale fizice și chimice, între care și stabilitatea sa.

Proprietățile fizice și chimice ale substanței furnizează informații importante cu privire la alegerea căii de administrare, cu privire la conceperea unor studii, precum și cu privire la manipularea și stocarea substanței.

Dezvoltarea unei metode de analiză care să permită o evaluare calitativă și cantitativă a substanței testate (inclusiv a principalelor sale impurități, dacă este posibil), în vehiculul de administrare și în materialul biologic, trebuie să preceadă efectuarea studiului.

Toate informațiile privind identificarea, proprietățile fizice și chimice, puritatea și comportamentul substanței testate trebuie înregistrate în raportul de testare.

B. **ÎNGRIJIREA ANIMALELOR**

În cadrul testelor de toxicitate se va proceda în mod obligatoriu la controlarea condițiilor de mediu și se vor utiliza tehnici adecvate de îngrijire a animalelor.

(i) *Condiții de adăpostire*

Condițiile de mediu în spațiile sau incintele rezervate animalelor experimentale trebuie să fie adaptate speciei utilizate. La șobolani, la șoareci și la cobai temperatura ambiantă trebuie să fie de 22 ± 3 °C, iar umiditatea relativă trebuie să fie de 30-70 %; la iepuri, temperatura ambiantă trebuie să fie de 20 ± 3 °C, iar umiditatea relativă trebuie să fie de 30-70 %.

Unele tehnici de testare sunt deosebit de sensibile la efectele termice; în asemenea cazuri indicații exacte sunt menționate în descrierea metodei de testare, cu privire la condițiile adecvate. În toate testele de toxicitate, temperatura și umiditatea trebuie controlate și înregistrate și trebuie să figureze în raportul final al studiului.

Alternarea de 12 de ore de lumină și de 12 de ore de întuneric va fi asigurată de iluminarea artificială. Detaliile cu privire la iluminare trebuie să fie înregistrate în raportul final al studiului.

Dacă metoda adoptată nu prevede alte condiții, animalele trebuie să fie adăpostite individual sau în grupuri mici de același sex în cuști. În cazul cuștilor colective nu se poate depăși numărul de cinci animale.

Este important ca rapoartele testelor efectuate pe animale să precizeze tipul de cuști utilizate și numărul de animale pe cuști, în momentul expunerii la substanța chimică și pe toată perioada de observație care urmează după test.

▼B

(ii) *Condiții de hrănire*

Regimul alimentar trebuie să aibă în vedere toate necesitățile nutriționale ale speciei supuse testului. În cazul în care substanțele sunt administrate prin hrană, este posibil ca valoarea nutrițională a hranei să fie diminuată printr-o interacțiune dintre substanță și un ingredient al hranei. Această eventualitate trebuie luată în considerare în momentul interpretării rezultatelor testului. Regimurile alimentare clasice folosite în laboratoare sunt acceptabile, apa de băut trebuie furnizată în mod nelimitat. Alegerea regimului alimentar poate fi ghidată de necesitatea de a garanta o proporție adecvată de substanță în cazul alegerii acestei căi de administrare.

Substanțele contaminante din alimentație care au un efect asupra toxicității nu trebuie să fie prezente în concentrații susceptibile de a influența rezultatele.

C. **METODE ALTERNATIVE**

Unul dintre obiectivele Uniunii Europene este promovarea dezvoltării și validării unor metode alternative care să furnizeze aceeași cantitate de informații ca testele actuale efectuate pe animale, dar pentru care să se necesite un număr mai redus de animale, care să minimizeze suferințele animalelor și să permită evitarea sacrificării acestora.

Din momentul în care asemenea metode sunt disponibile, ele trebuie avute în vedere ori de câte ori este posibil, în vederea caracterizării riscurilor, în vederea clasificării și etichetării substanțelor în funcție de riscurile intrinseci.

D. **EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA**

Extrapolarea directă la om a rezultatelor testelor efectuate asupra animalelor și a testelor *in vitro* nu este posibilă decât în anumite limite; acest lucru trebuie avut în vedere cu ocazia evaluării și interpretării rezultatelor testelor; pe de altă parte, atunci când au fost observate efecte nedorite la om, aceste informații pot fi folosite în vederea confirmării rezultatelor testelor.

E. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Majoritatea metodelor prezentate mai sus sunt elaborate în cadrul programului OCDE cu privire la principiile de testare, și trebuie puse în aplicare în conformitate cu principiile de bună practică de laborator, astfel încât să se garanteze recunoașterea reciprocă a datelor.

Informații suplimentare pot fi obținute din referințele citate în cadrul principiilor de bază ale OCDE, precum și din bibliografia de specialitate.

▼B

B.1 bis. **TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – PROCEDURA CU DOZĂ FIXĂ**

1. **METODĂ**

Acest test este echivalent cu Orientarea 420 (2001) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Metodele tradiționale de evaluare a toxicității acute utilizează ca punct final decesul animalelor. În 1984, British Toxicology Society a sugerat o nouă abordare pentru testarea toxicității acute, pe baza administrării unei serii de doze fixe (1). Această abordare evita uciderea animalelor ca punct final, bazându-se pe observarea unor semne clare de toxicitate la una dintre seriile de doze fixe. În urma unor studii de validare *in vivo*, britanice (2) și internaționale (3), procedura a fost adoptată ca metodă de testare în 1992. Ulterior, proprietățile statistice ale procedurii cu doză fixă au fost evaluate utilizând modele matematice într-o serie de studii (4) (5) (6). Împreună, studiile *in vivo* și cele de modelare au demonstrat că procedura este reproductibilă, utilizează mai puține animale și cauzează mai puțină suferință decât metodele tradiționale și poate fi utilizată pentru clasificarea substanțelor într-un mod similar cu celelalte metode de testare a toxicității acute.

Indicații pentru selectarea celei mai adecvate metode de testare pentru un anumit scop sunt prezentate în Liniile directoare privind testarea toxicității acute orale (7). Liniile directoare în cauză conțin, de asemenea, informații suplimentare privind aplicarea și interpretarea metodei de testare B.1 bis.

Ca un principiu al metodei, în studiul principal se utilizează exclusiv doze cu un nivel mediu de toxicitate și se evită administrarea dozelor care se estimează că sunt letale. De asemenea, nu este necesar să se administreze dozele despre care se știe că provoacă dureri și suferințe grave din cauza acțiunilor corozive și puternic iritante. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicații pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unor linii directoare separate (8).

Metoda furnizează informații privind proprietățile periculoase și permite clasificarea substanței în conformitate cu Sistemul global armonizat (SGA) de clasificare a substanțelor chimice care cauzează toxicitate acută (9).

Laboratorul care efectuează testul ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Printre aceste informații se numără identitatea și structura chimică a substanței; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* asupra substanței; date toxicologice privind substanțele înrudite structural și utilizarea sau utilizările anticipate ale substanței. Aceste informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și vor contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

▼B

1.2. DEFINIȚII

Toxicitate orală acută: efectele adverse care intervin după administrarea orală a unei singure doze dintr-o substanță sau a mai multor doze în cursul a 24 de ore.

Deces întârziat: un animal nu moare și nu pare muribund în termen de 48 ore, dar moare în perioada de observație de 14 zile.

Doză: cantitatea administrată din substanța de testat. Doza se exprimă ca greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (de exemplu mg/kg).

Toxicitate evidentă: termen general care descrie semne clare de toxicitate apărute după administrarea substanței de testat (a se vedea referința 3 pentru exemple), pe baza cărora se poate estima că următoarea doză fixă mai mare ar putea provoca dureri mari și semne persistente de suferință profundă, o stare muribundă [criteriile sunt prezentate în *Humane Endpoints Guidance Document* (8)] sau, probabil, decesul celor mai multe dintre animale.

SGA: Sistem global armonizat de clasificare a substanțelor și amestecurilor chimice. O activitate comună a OCDE (sănătatea oamenilor și mediul) a Comitetului de experți ONU pentru transportul bunurilor periculoase (proprietăți fizico-chimice) și a OIM (comunicarea pericolelor) și coordonată de Programul interorganizațional pentru buna gestionare a substanțelor chimice (IOMC).

Deces iminent: se așteaptă o stare muribundă sau decesul înainte de următorul moment de observare planificat. Printre semnele care indică această stare la rozătoare s-ar putea număra convulsii, poziție laterală, poziția culcată și tremurat [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

LD_{50} (doza letală mediană): o singură doză de substanță, derivată statistic, care se poate estima că va cauza decesul a 50 % dintre animale dacă este administrată pe cale orală. Valoarea LD_{50} se exprimă în greutatea de substanță de testat pe unitate de greutate a animalului de experiență (mg/kg).

Doză-limită: o doză la limita superioară a testării (2 000 sau 5 000 mg/kg).

Stare muribundă: starea precedentă decesului sau incapacitatea de a supraviețui, chiar în cazul administrării unui tratament [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

Deces previzibil: prezența semnelor clinice care indică decesul într-un moment cunoscut din viitor, înainte de sfârșitul planificat al experimentului, ca de exemplu: incapacitatea de a ajunge la apă și mâncare [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (8) pentru mai multe detalii].

▼B

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Unor grupuri de animale de același sex li se administrează doze fixe de 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg într-o procedură secvențială (în mod excepțional, poate fi luată în considerare o doză fixă suplimentară de 5 000 mg/kg, a se vedea punctul 1.6.2). Doza inițială se selectează pe baza unui studiu de observare pentru identificarea dozei care se presupune că produce unele semne de toxicitate fără a cauza efecte toxice grave sau decesul. Manifestările clinice și efectele asociate durerii, suferinței și decesului iminent sunt descrise detaliat într-un document de orientare OCDE (8). Altor grupuri de animale li se pot administra doze fixe mai mari sau mai mici, în funcție de prezența sau absența semnelor de toxicitate sau mortalitate. Această procedură continuă până la doza care provoacă toxicitate evidentă sau decesul unui singur animal, dacă nu se observă efecte la cea mai mare doză sau dacă decesul survine la cea mai mică doză.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Selectarea speciei de animale**

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În mod normal, se utilizează femele (7). Acest lucru este motivat de faptul că studiile din literatură asupra testelor convenționale LD_{50} arată că, de obicei, diferențele de sensibilitate între sexe sunt mici, dar în cazurile în care se observă diferențe, femelele sunt, în general, puțin mai sensibile (10). Cu toate acestea, în cazul în care informațiile privind proprietățile toxicologice sau toxicocinetice ale unor substanțe chimice înrudite structural arată că este probabil ca masculii să fie mai sensibili, se utilizează acest sex. Dacă testul se efectuează pe masculi, se oferă justificări adecvate.

Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase provenind din liniile utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. La începerea testului, fiecare animal trebuie să aibă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea sa trebuie să se situeze într-un interval de ± 20 % față de greutatea medie a animalelor testate anterior.

1.4.2. **Condiții de adăpostire și hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 ^{o}C (± 3 ^{o}C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal.

1.4.3. **Pregătirea animalelor**

Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cu cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

▼B

1.4.4. **Pregătirea dozelor**

În general, substanțele de testat se administrează într-un volum constant indiferent de dozele testate, variindu-se concentrația preparatului. În cazul testării unui produs sau amestec final lichid, utilizarea substanței de testat nediluate, și anume la o concentrație constantă, poate fi mai relevantă pentru evaluarea ulterioară a riscurilor substanței și este impusă de unele autorități de reglementare. În orice caz, nu trebuie depășit volumul dozei maxime de administrat. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. La rozătoare, volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală; cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase, pot fi administrați 2 ml/100 g greutate corporală. În ceea ce privește forma de preparare a dozei, se recomandă utilizarea, ori de câte ori este posibil, a unei soluții/suspensii/emulsii apoase, urmată, în ordinea preferinței, de o soluție/suspensie/emulsie în ulei (de exemplu, în ulei de porumb) și, eventual, soluții în alte vehicule. Pentru vehicule altele decât apa, este necesar să se cunoască caracteristicile toxicologice ale vehiculului. Dozele se prepară cu puțin timp înaintea administrării, cu excepția cazului în care stabilitatea preparatului în perioada în care urmează a fi utilizat este cunoscută și s-a demonstrat că este acceptabilă.

1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează într-o singură doză, prin gavaj, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. În cazurile deosebite în care nu este posibilă administrarea unei singure doze, doza poate fi administrată în fracțiuni mai mici pe parcursul unei perioade de maximum 24 de ore.

Animalele nu se hrănesc înainte de administrarea dozei (de exemplu, șobolanii nu trebuie să fie hrăniți peste noapte, dar pot primi apă; șoarecii nu trebuie să fie hrăniți, dar pot primi apă, cu 3-4 ore înainte). După perioada de flămânzire, animalele se cântăresc și se administrează substanța de testat. După administrarea substanței, animalele pot fi private din nou de hrană, 3-4 ore la șobolani și 1-2 ore la șoareci. Dacă doza se administrează fracționat într-o perioadă de timp, este posibil să fie necesar să li se ofere animalelor hrană și apă, în funcție de durata perioadei de administrare.

1.5.2. **Studiu de observare**

Scopul studiului de observare este de a permite selectarea dozei inițiale adecvate pentru studiul principal. Substanța de testat se administrează, într-o procedură secvențială, câte unui animal, conform diagramelor din apendicele 1. Studiul de observare este finalizat când se poate lua o decizie privind doza inițială pentru studiul principal (sau dacă survine decesul unui animal la cea mai mică doză fixă).

Doza inițială pentru studiul de observare se selectează dintre dozele fixe de 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg ca doza care se așteaptă că provoace toxicitate evidentă, dacă este posibil, pe baza datelor obținute *in vivo* și *in vitro* pentru aceeași substanță chimică sau alte substanțe înrudite structural. În absența acestor informații, doza inițială va fi de 300 mg/kg.

Dozele se administrează la un interval de minimum 24 de ore pentru fiecare animal. Toate animalele trebuie observate cel puțin 14 zile.

▼B

În mod excepțional și doar dacă acest lucru este necesar pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi administrată o doză suplimentară mai mare, de 5 000 mg/kg (a se vedea apendicele 3). Din motive justificate de bunăstarea animală, testarea pe animale a substanțelor din categoria 5 SGA (2 000-5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor, a sănătății animale sau a mediului.

În cazurile în care un animal căruia i s-a administrat doza fixă cea mai redusă (5 mg/kg) în cadrul studiului de observare moare, procedura normală este de a încheia studiul și de a încadra substanța în categoria 1 SGA (conform anexei 1). Cu toate acestea, dacă este necesară o confirmare suplimentară a clasificării, se poate aplica o procedură suplimentară opțională, descrisă în continuare. Se administrează o doză de 5 mg/kg unui alt animal. Dacă și al doilea animal moare, se confirmă categoria 1 SGA, iar studiul se încheie imediat. Dacă al doilea animal supraviețuiește, se administrează o doză de 5 mg/kg unui nou grup, de maximum 3 animale. Deoarece riscul de mortalitate este foarte ridicat, dozele vor fi administrate secvențial, pentru protecția bunăstării animale. Intervalul de timp între administrarea dozelor la fiecare animal trebuie să fie suficient pentru a stabili probabilitatea ca animalul anterior să supraviețuiască. Dacă survine decesul unui alt animal, secvența de administrare se încheie imediat, fără testarea pe alte animale. Deoarece decesul celui de-al doilea animal (indiferent de numărul de animale testate în momentul încheierii studiului) se încadrează în rezultatul A (2 sau mai multe decese), se aplică regula de clasificare din apendicele 2 la o doză fixă de 5 mg/kg (categoria 1, dacă survin două sau mai multe decese, sau categoria 2 dacă survine un singur deces). În plus, apendicele 4 ofertă indicații pentru clasificarea în sistemul UE, până la punerea în aplicare a noului SGA.

1.5.3. **Studiul principal**

1.5.3.1. *Numărul de animale și nivelul dozelor*

Acțiunile care se întreprind după administrarea dozei inițiale sunt indicate în diagramele din apendicele 2. Se adoptă unul dintre cele trei cursuri de acțiune: fie se oprește testarea și se atribuie clasa adecvată de clasificare a periculozității, fie se continuă testarea cu o doză fixă mai mare sau cu o doză fixă mai mică. Cu toate acestea, pentru a proteja animalele, o doză care a cauzat decesul animalelor în studiul de observare nu va fi reutilizată în studiul principal (a se vedea apendicele 2). Experiența a demonstrat că, cel mai probabil, după administrarea dozei inițiale, substanța va putea fi clasificată și nu vor fi necesare teste suplimentare.

În mod normal, se utilizează un număr total de cinci animale de același sex pentru fiecare nivel investigat al dozei. Grupul de cinci animale va fi format dintr-un animal căruia i s-a administrat doza selectată în studiul de orientare și alte patru animale (cu excepția cazului excepțional în care nivelul dozei utilizat în studiul principal nu a fost inclus în studiul de orientare).

Intervalul de timp dintre administrarea dozelor de la fiecare nivel la fiecare animal se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Administrarea următoarei doze se amână până când există certitudinea că animalele testate anterior vor supraviețui. Se recomandă un interval de 3 sau 4 zile între administrarea fiecărui nivel, pentru a permite observarea toxicității întârziate. Intervalul de timp poate fi adaptat după caz, de exemplu în cazul unor rezultate neconcludente.

▼B

Dacă se ia în considerare utilizarea dozei fixe maxime de 5 000 mg/kg, se aplică procedura prevăzută în apendicele 3 (a se vedea, de asemenea, punctul 1.6.2).

1.5.3.2. *Testul-limită*

Testul-limită se utilizează în special în situațiile în care experimentatorul are informații care arată că este posibil ca materialul testat să nu fie toxic, având o toxicitate puțin peste dozele-limită reglementate. Informațiile privind toxicitatea materialului de testat pot fi deduse din cunoștințele despre compuși, amestecuri și produse similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că materialul de testat este toxic, se efectuează testul principal.

Urmând procedura normală, un studiu de observare cu o doză inițială de 2 000 mg/kg (sau, în cazuri excepționale, 5 000 mg/kg), urmat de administrarea aceleași doze altor patru animale, constituie testul-limită conform acestei linii directoare.

1.6. OBSERVAȚII

Animalele sunt observate individual după administrarea dozelor, cel puțin o dată în primele 30 de minute, periodic în primele 24 de ore, acordându-li-se o atenție specială în primele 4 ore, și, ulterior, zilnic, timp de 14 zile, cu excepția cazului în care trebuie excluse din studiu și eutanasiate din motive de bunăstare animală sau sunt găsite moarte. Cu toate acestea, perioada de observație nu se stabilește rigid. Ea se determină în funcție de reacțiile toxice și momentul declanșării acestora și de durata perioadei de recuperare și, prin urmare, poate fi prelungită, dacă este necesar. Momentele în care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere (11). Toate observațiile se înregistrează sistematic, întocmindu-se fișe individuale pentru fiecare animal.

Vor fi necesare observații suplimentare în cazul în care animalele manifestă în continuare semne de toxicitate. Observațiile vizează modificările pielii și blănii, ochilor și membranelor mucoaselor, modificările activității sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos central și vegetativ și ale activității somato-motorii și modificările de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremuratului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

1.6.1. **Greutatea corporală**

Animalele se cântăresc puțin înainte de administrarea substanței de testat și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Se calculează și se înregistrează variațiile de greutate. La sfârșitul testului, animalele care au supraviețuit sunt cântărite și apoi eutanasiate.

▼B

1.6.2. **Patologie**

Toate animalele participante la test (inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din motive de bunăstare animală) sunt supuse unei autopsii macroscopice. Se înregistrează toate modificările patologice majore intervenite la fiecare animal. Se poate efectua, de asemenea, o examinare microscopică a organelor care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore de la administrarea dozei inițiale, întrucât ar putea furniza informații utile.

2. **DATE**

Se furnizează date individuale despre animale. În plus, se face un rezumat tabelar al tuturor datelor, prezentând pentru fiecare grup testat, numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Substanța de testat:

— natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);

— date de identificare, inclusiv numărul CAS.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

Animalele de experiență:

— specie/sușă utilizată;

— starea microbiologică a animalelor, dacă se cunoaște;

— numărul, vârsta și sexul animalelor (inclusiv, dacă este cazul, o justificare pentru utilizarea de masculi în locul femelelor);

— sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;

Condiții de testare:

— detalii privind prepararea substanței de testat, inclusiv detalii privind forma fizică a materialului administrat;

— detalii privind administrarea substanței de testat, inclusiv volumul dozelor și durata administrării;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa hranei, sursa apei);

— o justificare pentru selectarea dozei inițiale.

▼B

Rezultate:

— un tabel cu datele privind reacția și nivelul dozei la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

— un tabel cu greutatea corporală și variațiile acesteia;

— greutatea fiecărui animal în ziua administrării dozei, la intervale săptămânale ulterior și în momentul morții sau al eutanasierii;

— data și ora morții, dacă a survenit înainte de momentul planificat pentru sacrificare;

— graficul declanșării semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;

— concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, p. 85-92.

2. Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, p. 279-291.

3. Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, p. 469-482.

4. Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, p. 313-324.

5. Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183-196.

7. OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

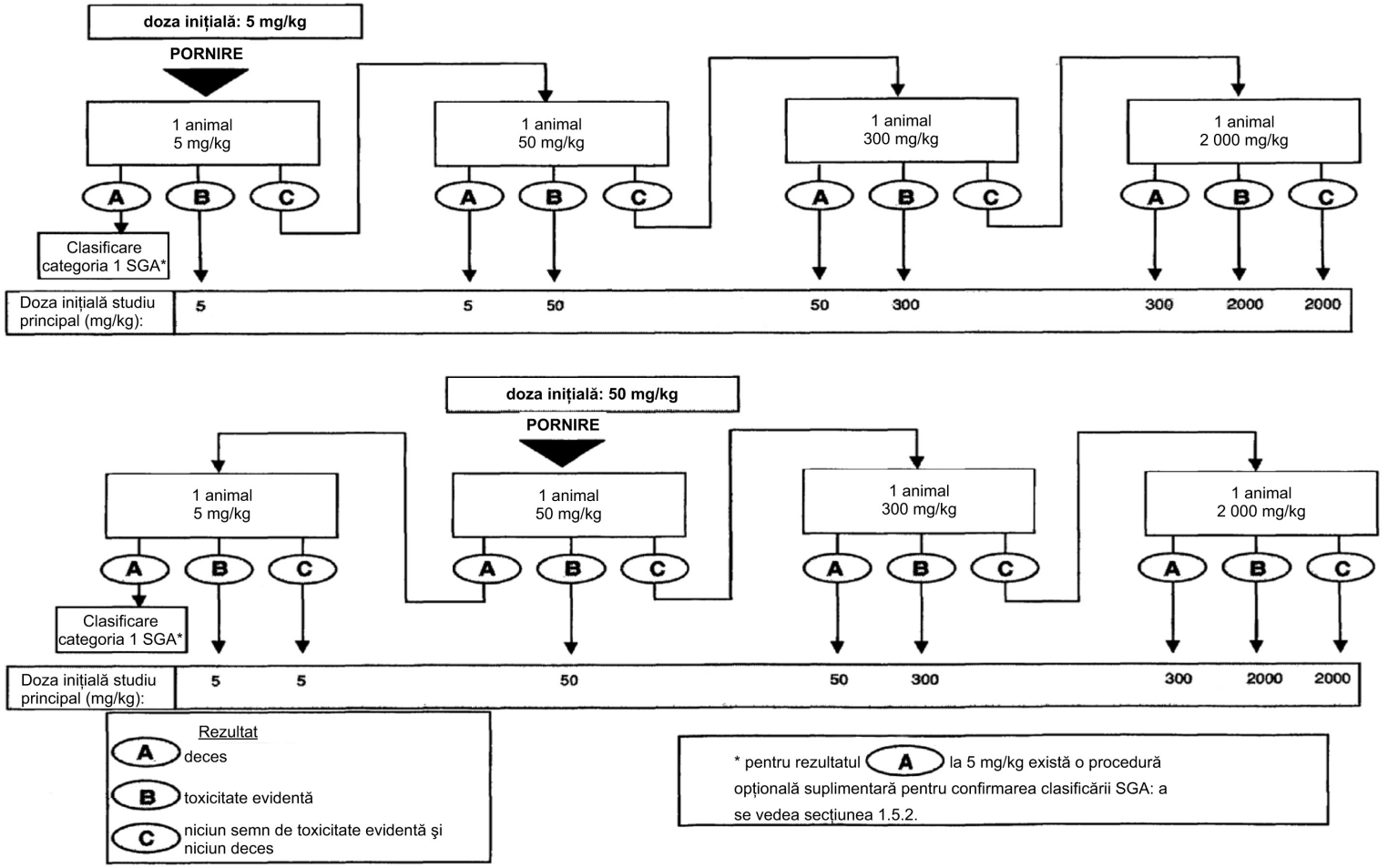
9. OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

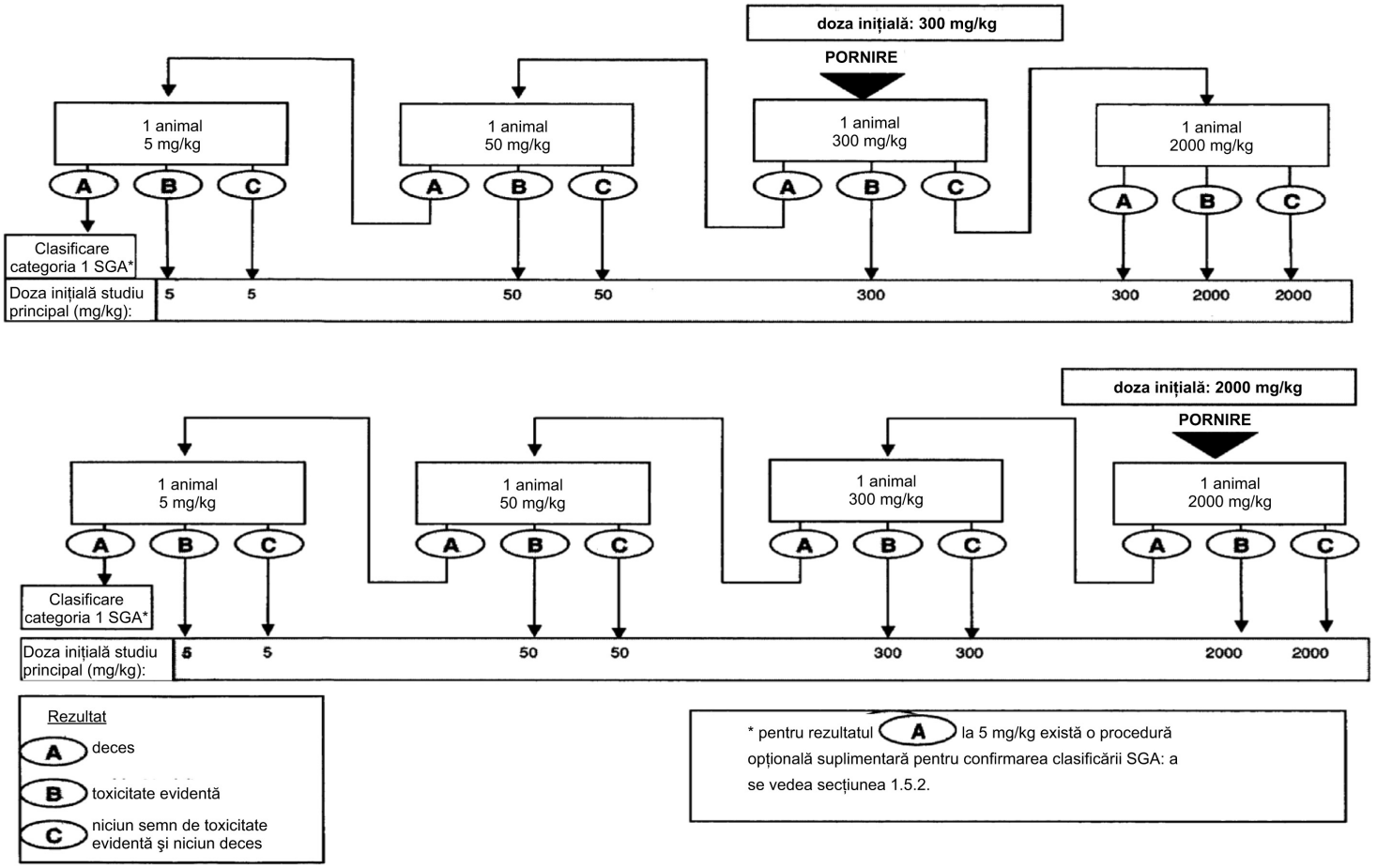
10. Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, p. 223-231.

11. Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

APENDICELE 1

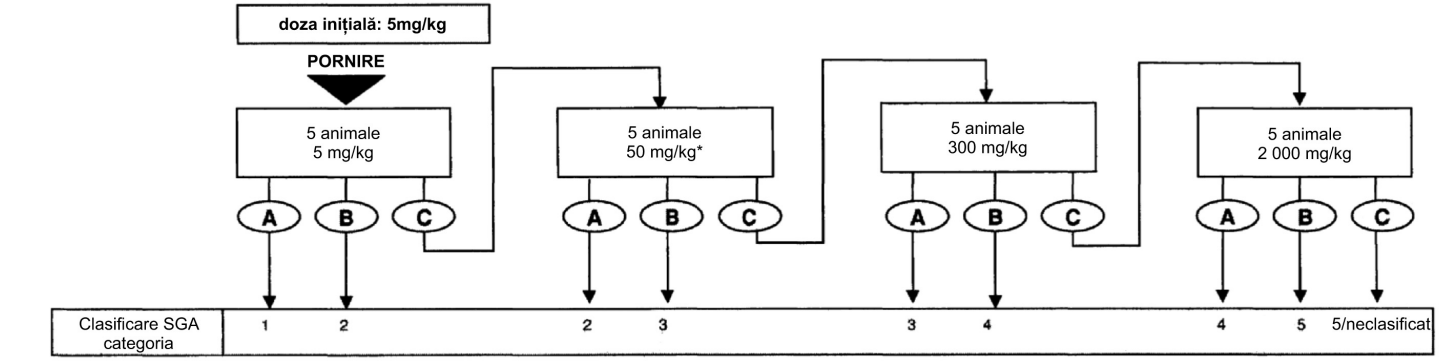
DIAGRAMA PENTRU STUDIUL DE OBSERVARE

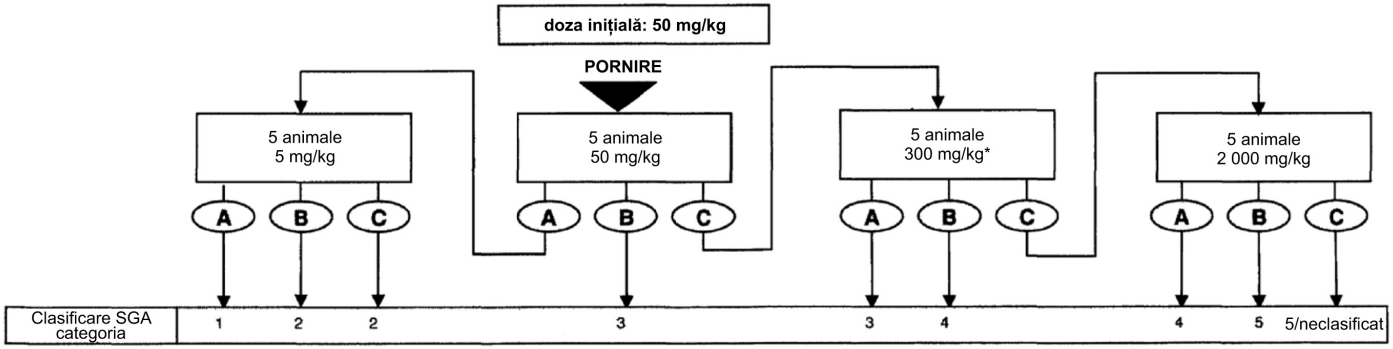



doza inițială: 300 mg/kg
PORNIRE
1 animal 5 mg/kg
1 animal 50 mg/kg
1 animal 300 mg/kg
1 animal 2000 mg/kg
A B C
Clasificare categoria 1 SGA*
Doza inițială studiu principal (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
doza inițială: 2000 mg/kg
PORNIRE
1 animal 5 mg/kg
1 animal 50 mg/kg
1 animal 300 mg/kg
1 animal 2000 mg/kg
A B C
Clasificare categoria 1 SGA*
Doza inițială studiu principal (mg/kg):
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Rezultat
A deces
B toxicitate evidentă
C niciun semn de toxicitate evidentă și niciun deces
* pentru rezultatul A la 5 mg/kg există o procedură opțională suplimentară pentru confirmarea clasificării SGA: a se vedea secțiunea 1.5.2.

APENDICELE 2

DIAGRAMA PENTRU STUDIUL PRINCIPAL





Rezultat

A ≥ 2 decese

B ≥ 1 toxicitate evidentă şi/sau 1 deces

C niciun semn de toxicitate evidentă şi niciun deces

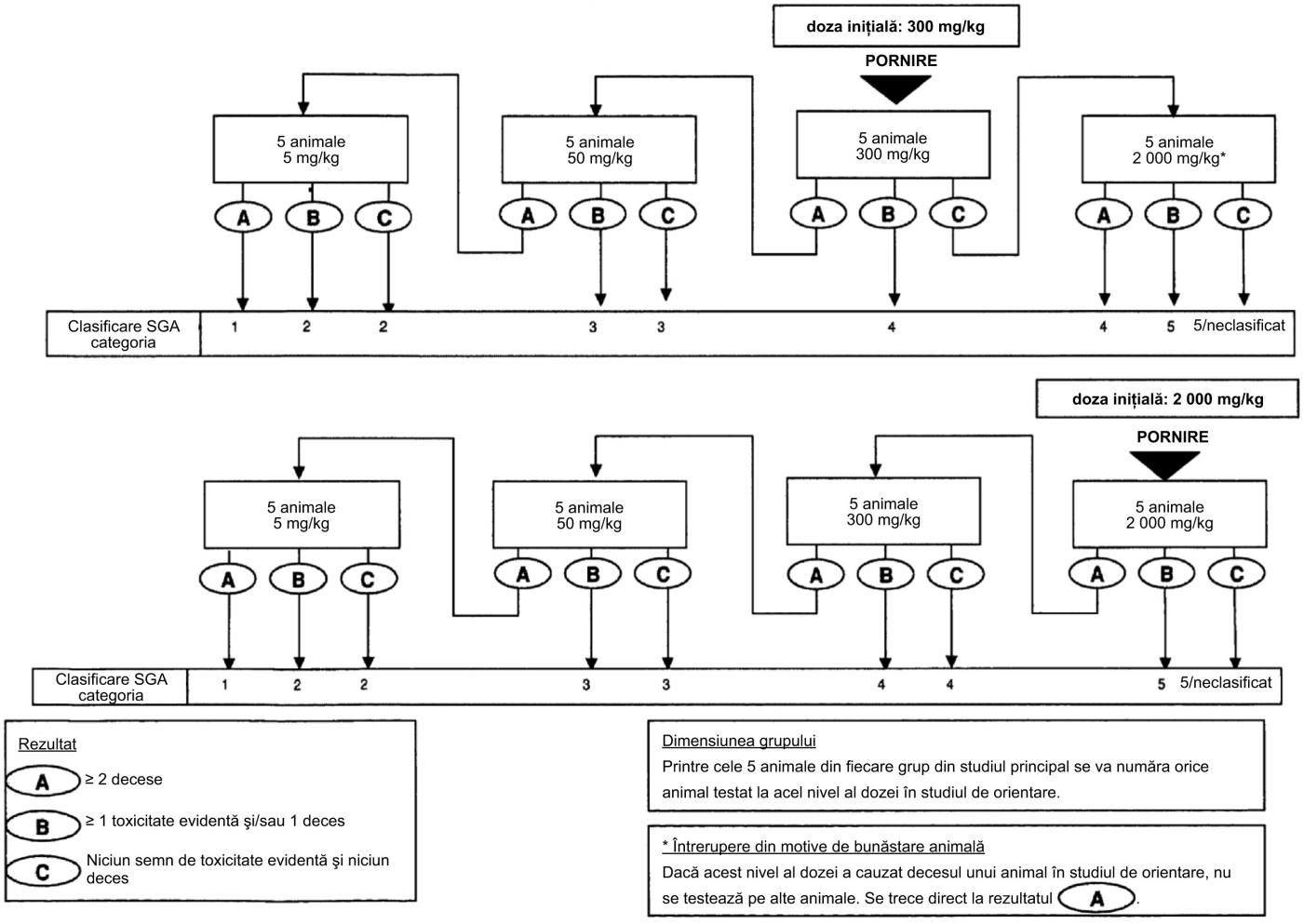
Dimensiunea grupului

Printre cele 5 animale din fiecare grup din studiul principal se va număra orice animal testat la acel nivel al dozei în studiul de orientare.

* Întrerupere din motive de bunăstare animală

Dacă acest nivel al dozei a cauzat decesul unui animal în studiul de orientare, nu se testează pe alte animale. Se trece direct la rezultatul A

▼B


doza inițială: 300 mg/kg
PORNIRE
5 animale 5 mg/kg
5 animale 50 mg/kg
5 animale 300 mg/kg
5 animale 2 000 mg/kg*
A B C
Clasificare SGA categoria
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neclasificat
doza inițială: 2 000 mg/kg
PORNIRE
5 animale 5 mg/kg
5 animale 50 mg/kg
5 animale 300 mg/kg
5 animale 2 000 mg/kg
A B C
Clasificare SGA categoria
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neclasificat
Rezultat
A ≥ 2 decese
B ≥ 1 toxicitate evidentă şi/sau 1 deces
C Niciun semn de toxicitate evidentă şi niciun deces
Dimensiunea grupului
Printre cele 5 animale din fiecare grup din studiul principal se va număra orice animal testat la acel nivel al dozei în studiul de orientare.
* Întrerupere din motive de bunăstare animală
Dacă acest nivel al dozei a cauzat decesul unui animal în studiul de orientare, nu se testează pe alte animale. Se trece direct la rezultatul A.

▼B

APENDICELE 3

CRITERIILE PENTRU CLASIFICAREA SUBSTANȚELOR DE TESTAT CU VALORI ESTIMATE ALE LD_{50} DE PESTE 2 000 MG/KG FĂRĂ A FI NECESARĂ TESTAREA

Criteriile pentru categoria de periculozitate 5 au ca scop să permită identificarea substanțelor de testat care prezintă un pericol relativ scăzut de toxicitate acută, dar care, în anumite circumstanțe, pot prezenta pericole pentru populațiile vulnerabile. Se anticipează că aceste substanțe au o LD_{50} orală și dermică între 2 000 și 5 000 mg/kg sau doze echivalente pentru alte căi de administrare. Substanța de testat se clasifică în categoria de periculozitate definită prin: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 din SGA) în următoarele cazuri:

(a) dacă este încadrată în această categorie de oricare dintre diagramele de testare din apendicele 2, pe baza incidenței deceselor;

(b) dacă sunt deja disponibile date fiabile care arată că LD_{50} se situează în limitele categoriei 5 sau alte studii pe animale sau privind efectele toxice asupra oamenilor indică o problemă acută pentru sănătatea oamenilor;

(c) prin extrapolare, estimare sau măsurarea de date, dacă nu se justifică clasificarea într-o clasă de periculozitate mai mare; și

— sunt disponibile informații fiabile privind efecte toxice semnificative asupra oamenilor; sau

— se observă decese la testarea până la valorile din categoria 4 pe cale orală; sau

— dacă concluziile unor experți confirmă semne clinice semnificative de toxicitate, la testarea până la valorile din categoria 4, cu excepția diareii, piloerecției sau a aspectului neîngrijit; sau

— dacă concluziile experților confirmă informații fiabile care indică potențiale efecte acute semnificative conform altor studii asupra animalelor.

TESTAREA CU DOZE PESTE 2 000 MG/KG

În mod excepțional și exclusiv în cazurile în care este justificată pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi luată în considerare utilizarea unei doze fixe mai mari, de 5 000 mg/kg. Recunoscând necesitatea de a proteja bunăstarea animală, testarea cu 5 000 mg/kg este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie direct relevante pentru protecția sănătății animale sau a sănătății oamenilor (9).

Studiul de observare

Regulile de luare a deciziilor pentru procedura secvențială prezentată în apendicele 1 sunt extinse pentru a include doza de 5 000 mg/kg. Astfel, dacă într-un studiu de observare se utilizează o doză inițială de 5 000 mg/kg, rezultatul A (deces) impune testarea unui alt animal la 2 000 mg/kg; rezultatele B și C (toxicitate evidentă sau fără semne de toxicitate) permit selectarea dozei de 5 000 mg/kg ca doză inițială pentru studiul principal. În mod similar, dacă se folosește o altă doză decât 5 000 mg/kg, testarea va avansa la 5 000 mg/kg în cazul în care se obțin rezultatele B sau C la 2 000 mg/kg: un rezultat ulterior A, la o doză de 5 000 mg/kg, va impune o doză inițială pentru studiul principal de 2 000 mg/kg, iar rezultatele B și C vor impune o doză inițială pentru studiul principal de 5 000 mg/kg.

▼B

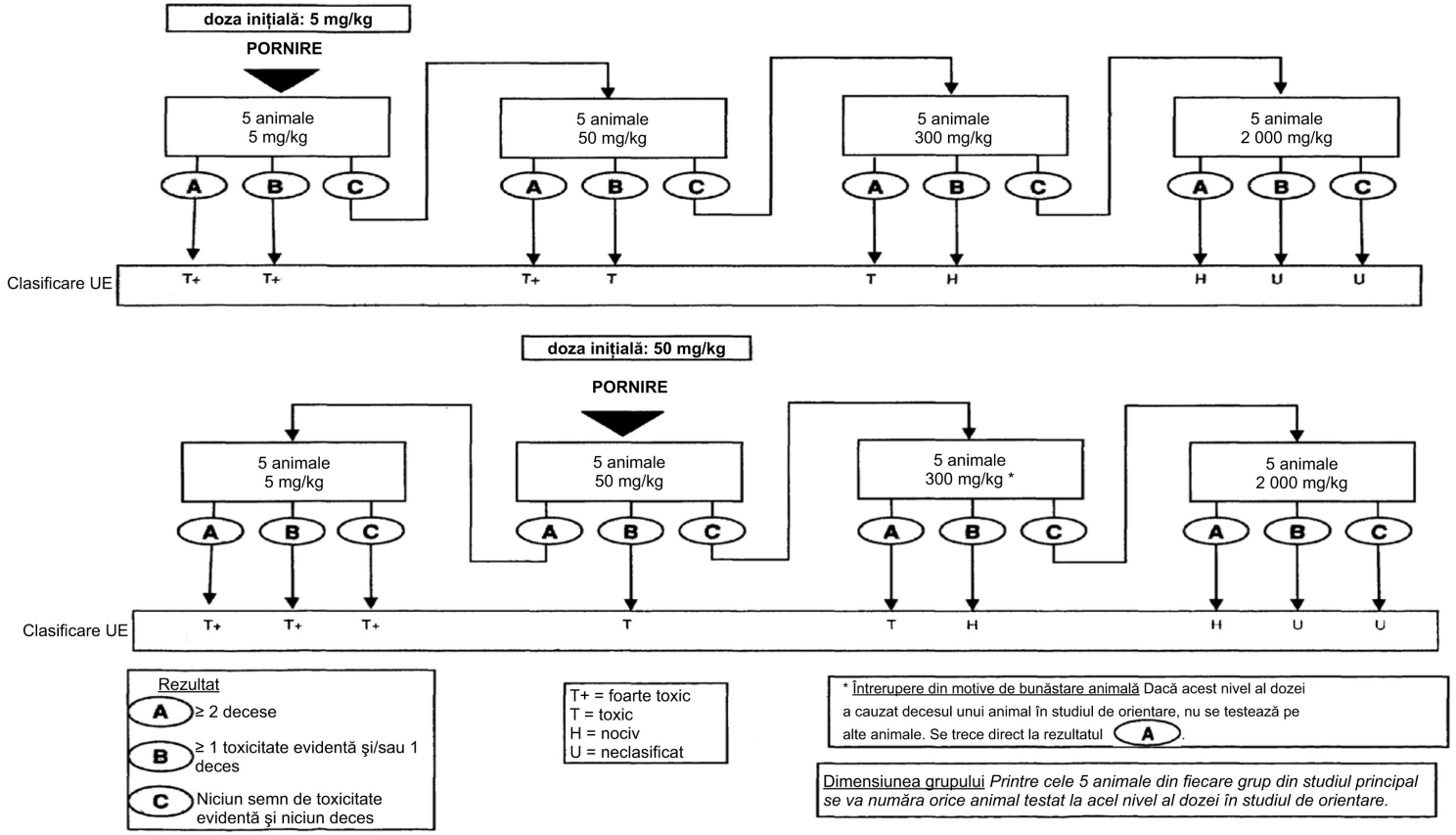
Studiul principal

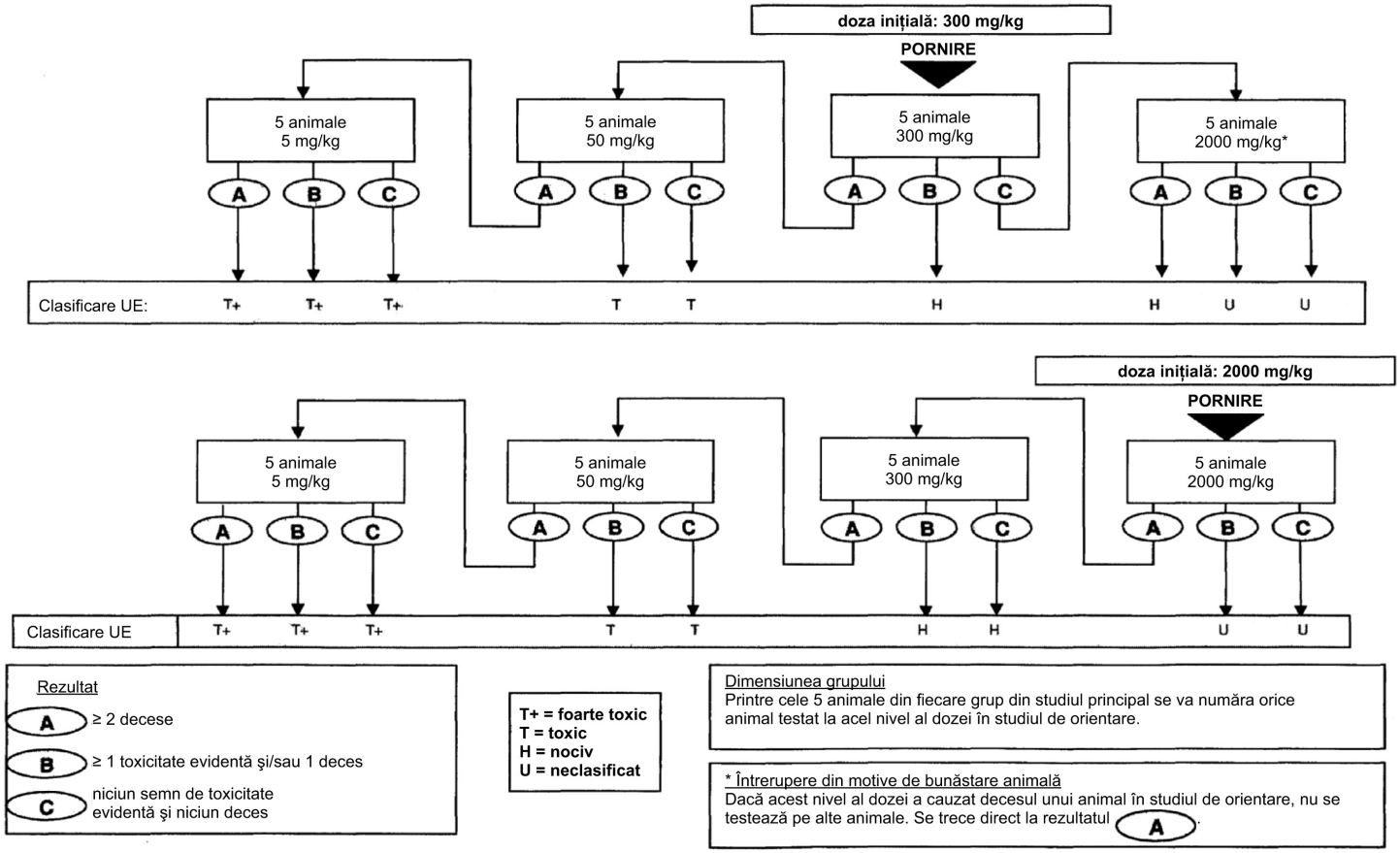
Regulile de luare a deciziilor pentru procedura secvențială prezentată în apendicele 2 sunt extinse pentru a include doza de 5 000 mg/kg. Astfel, dacă doza inițială pentru studiul principal este de 5 000 mg/kg, rezultatul A (≥ 2 decese) va impune testarea unui al doilea grup la 2 000 mg/kg; rezultatul B (toxicitate evidentă și/sau ≤ 1 deces) sau C (fără semne de toxicitate) va conduce la neclasificarea conform SGA. În mod similar, dacă se utilizează o doză inițială alta decât cea de 5 000 mg/kg, testarea continuă cu 5 000 mg/kg în cazul obținerii rezultatului C la 2 000 mg/kg; un rezultat ulterior A, la doza de 5 000 mg/kg, va conduce la clasificarea substanței în categoria 5 SGA, iar rezultatele B sau C vor conduce la neclasificarea substanței.

APENDICELE 4

METODA DE TESTARE B.1 bis

Linii directoare pentru clasificarea conform schemei UE pentru perioada de tranziție până la punerea completă în aplicare a Sistemului global armonizat de clasificare (SGA) (preluate din referința 8)




doza inițială: 300 mg/kg
PORNIRE
5 animale 5 mg/kg
5 animale 50 mg/kg
5 animale 300 mg/kg
5 animale 2000 mg/kg*
A B C
Clasificare UE: T+ T+ T+ T T H H U U
doza inițială: 2000 mg/kg
PORNIRE
5 animale 5 mg/kg
5 animale 50 mg/kg
5 animale 300 mg/kg
5 animale 2000 mg/kg
Clasificare UE T+ T+ T+ T T H H U U
Rezultat
A ≥ 2 decese
B ≥ 1 toxicitate evidentă şi/sau 1 deces
C niciun semn de toxicitate evidentă şi niciun deces
T+ = foarte toxic
T = toxic
H = nociv
U = neclasificat
Dimensiunea grupului
Printre cele 5 animale din fiecare grup din studiul principal se va număra orice animal testat la acel nivel al dozei în studiul de orientare.
* Întrerupere din motive de bunăstare animală
Dacă acest nivel al dozei a cauzat decesul unui animal în studiul de orientare, nu se testează pe alte animale. Se trece direct la rezultatul A.

▼B

B.1 tris. **TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ**

1. **METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 423 (2001) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Metoda clasei de toxicitate acută (1) prezentată în acest test este o procedură secvențială care utilizează 3 animale de același sex într-o etapă. În funcție de mortalitatea și/sau starea muribundă a animalelor, pot fi necesare, în medie, 2-4 etape pentru a permite determinarea toxicității acute a substanței de testat. Această procedură este reproductibilă, utilizează foarte puține animale și permite clasificarea substanțelor într-un mod similar cu celelalte metode de testare a toxicității acute. Metoda clasei de toxicitate acută se bazează pe evaluări biometrice (2) (3) (4) (5) cu doze fixe, separate adecvat pentru a permite clasificarea unei substanțe pentru includerea în diverse categorii și evaluarea riscurilor. Metoda, adoptată în 1996, a fost validată intens *in vivo* comparativ cu datele LD_{50} obținute din literatură, atât la nivel național (6), cât și la nivel internațional (7).

Pentru indicații privind selectarea celei mai adecvate metode de testare pentru un anumit scop, consultați *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (8). Acest document conține, de asemenea, informații suplimentare pentru aplicarea și interpretarea metodei de testare B.1 tris.

Nu este necesar să se administreze substanțele de testat la doze despre care se știe că provoacă dureri mari și suferințe profunde din cauza acțiunilor corozive și pronunțat iritante. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicații pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unor linii directoare separate (9).

Metoda utilizează doze predefinite, iar rezultatele permit clasarea și clasificarea unei substanței în conformitate cu Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor chimice care provoacă toxicitate acută (10).

În principiu, această metodă nu are ca scop să permită calcularea unei valori exacte a LD_{50}, dar permite determinarea nivelurilor definite de expunere letale, deoarece decesul unei proporții dintre animale rămâne principalul punct final al acestui test. Metoda permite determinarea unei valori a LD_{50} doar dacă cel puțin două doze determină o mortalitate peste 0 %, dar mai mică decât 100 %. Utilizarea unor doze predefinite, indiferent de substanța de testat, și faptul că clasificarea se face explicit în funcție de numărul de animale observate în diverse stări favorizează consecvența și repetabilitatea datelor prezentate de diverse laboratoare.

▼B

Laboratorul care efectuează testul ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Printre aceste informații se numără identitatea și structura chimică a substanței; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* asupra substanței; date toxicologice privind substanțele înrudite structural și utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) a(le) substanței. Aceste informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și va contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

1.2. DEFINIȚII

Toxicitate orală acută: se referă la efectele adverse care intervin după administrarea orală a unei singure doze dintr-o substanță sau a mai multor doze în cursul a 24 de ore.

Deces întârziat: înseamnă că un animal nu moare și nu pare muribund în termen de 48 ore, dar moare în perioada de observație de 14 zile.

Doză: este cantitatea administrată din substanța de testat. Doza se exprimă ca greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (de exemplu: mg/kg).

SGA: Sistemul global armonizat de clasificare a substanțelor și amestecurilor chimice. O activitate comună a OCDE (sănătatea oamenilor și mediul), a Comitetului de experți ONU pentru transportul bunurilor periculoase (proprietăți fizico-chimice) și a OIM (comunicarea pericolelor) și coordonată de Programul interorganizațional pentru buna gestionare a substanțelor chimice (IOMC).

Deces iminent: când se așteaptă o stare muribundă sau decesul înainte de următorul moment de observare planificat. Printre semnele care indică această stare la rozătoare s-ar putea număra convulsii, poziție laterală, poziția culcată și tremurat [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].

LD_{50} (doza letală mediană): este o singură doză de substanță, derivată statistic, care se poate estima că va cauza decesul a 50 % dintre animale dacă este administrată pe cale orală. Valoarea LD_{50} se exprimă în greutatea de substanță de testat per unitate de greutate a animalului de experiență (mg/kg).

Doză-limită: se referă la o doză la limita superioară a testării (2 000 sau 5 000 mg/kg).

Stare muribundă: starea precedentă decesului sau incapacitatea de a supraviețui, chiar în cazul administrării unui tratament [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].

Deces previzibil: prezența semnelor clinice care indică decesul într-un moment cunoscut din viitor, înainte de sfârșitul planificat al experimentului, ca de exemplu: incapacitatea de a ajunge la apă și mâncare [a se vedea *Humane Endpoint Guidance Document* (9) pentru mai multe detalii].

▼B

1.3. PRINCIPIUL TESTULUI

Principiul acestui test este că, prin aplicarea unei proceduri secvențiale, cu utilizarea unui număr minim de animale în fiecare etapă, se obțin informații suficiente privind toxicitatea acută a substanței de testat pentru a permite clasificarea acesteia. Substanța se administrează oral unui grup de animale de experiență, la una dintre dozele definite. Substanța se testează conform unei proceduri secvențiale, în fiecare etapă utilizându-se trei animale de același sex (de obicei, femele). Absența sau prezența mortalității cauzate de substanța de testat la animalele testate într-o etapă determină etapa următoare, astfel;

— nu sunt necesare alte teste;

— administrarea aceleiași doze altor trei animale;

— administrarea următoarei doze mai mari sau mai mici altor trei animale.

Detaliile procedurii de testare sunt prezentate în apendicele 1. Metoda permite adoptarea unei concluzii privind clasificarea substanței de testat într-una dintre clasele de toxicitate delimitate de valori prestabilite ale LD_{50}.

1.4. DESCRIEREA METODEI

1.4.1. **Selectarea speciei de animale**

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În mod normal, se utilizează femele (9). Acest lucru este motivat de faptul că studiile din literatură asupra testelor convenționale LD_{50} arată că, deși diferențele de sensibilitate între sexe sunt mici, în cazurile în care se observă diferențe, femelele sunt, în general, puțin mai sensibile (11). Cu toate acestea, în cazul în care informațiile privind proprietățile toxicologice sau toxicocinetice ale unor substanțe chimice înrudite structural arată că este probabil ca masculii să fie mai sensibili, se utilizează acest sex. Dacă testul se efectuează pe masculi, se oferă justificări adecvate.

Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase provenind din liniile utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. La începerea testului, fiecare animal trebuie să aibă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea sa trebuie să se situeze într-un interval de ± 20 % față de greutatea medie a animalelor testate anterior.

1.4.2. **Condiții de adăpostire și hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal.

▼B

1.4.3. **Pregătirea animalelor**

Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cu cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

1.4.4. **Pregătirea dozelor**

În general, substanțele de testat se administrează într-un volum constant indiferent de dozele testate, variind concentrația preparatului. În cazul testării unui produs sau amestec final lichid, utilizarea substanței de testat nediluate, și anume la o concentrație constantă, poate fi mai relevantă pentru evaluarea ulterioară a riscurilor substanței și este impusă de unele autorități de reglementare. În orice caz, nu trebuie depășit volumul dozei maxime de administrat. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. La rozătoare, volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală; cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase, pot fi administrați 2 ml/100 g greutate corporală. În ceea ce privește forma de preparare a dozei, se recomandă utilizarea, ori de câte ori este posibil, a unei soluții/suspensii/emulsii apoase, urmată, în ordinea preferinței, de o soluție/suspensie/emulsie în ulei (de exemplu, în ulei de porumb) și, eventual, soluții în alte vehicule. Pentru vehicule altele decât apa, este necesar să se cunoască caracteristicile toxicologice ale vehiculului. Dozele se prepară cu puțin timp înaintea administrării, cu excepția cazului în care stabilitatea preparatului în perioada în care urmează a fi utilizat este cunoscută și s-a demonstrat că este acceptabilă.

1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează într-o singură doză, prin gavaj, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. În cazurile deosebite în care nu este posibilă administrarea unei singure doze, doza poate fi administrată în fracțiuni mai mici pe parcursul unei perioade de maximum 24 de ore.

Animalele nu se hrănesc înainte de administrarea dozei (de exemplu, șobolanii nu trebuie să fie hrăniți peste noapte, dar pot primi apă; șoarecii nu trebuie să fie hrăniți, dar pot primi apă, cu 3-4 ore înainte). După perioada de flămânzire, animalele se cântăresc și li se administrează substanța de testat. După administrarea substanței, animalele pot fi private din nou de hrană, 3-4 ore la șobolani și 1-2 ore la șoareci. Dacă doza se administrează fracționat într-o perioadă de timp, este posibil să fie necesar să li se ofere animalelor hrană și apă, în funcție de durata perioadei de administrare.

1.5.2. **Numărul de animale și nivelul dozelor**

În fiecare etapă se utilizează trei animale. Nivelul dozei utilizate ca doză inițială se selectează din cele patru doze fixe: 5, 50, 300 și 2 000 mg/kg greutate corporală. Se alege nivelul dozei inițiale cu cea mai mare probabilitate de a produce decesul unora dintre animalele cărora li se administrează. Diagramele din apendicele 1 descriu procedura de urmat pentru fiecare doză inițială. În plus, apendicele 4 prezintă indicații pentru clasificarea în sistemul UE până la punerea în aplicare a noului SGA.

▼B

Dacă informațiile disponibile sugerează că este puțin probabil ca cel mai ridicat nivel al dozei inițiale (2 000 mg/kg greutate corporală) să provoace decese, se efectuează testul-limită. Dacă nu există informații privind substanța de testat, din motive de bunăstare animală, se recomandă utilizarea dozei inițiale de 300 mg/kg greutate corporală.

Intervalul de timp dintre administrarea dozelor diverselor grupuri se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Administrarea următoarei doze se amână până când există certitudinea că animalele testate anterior vor supraviețui.

În mod excepțional și doar dacă acest lucru este necesar pentru îndeplinirea unor cerințe specifice, poate fi luată în considerare o doză suplimentară mai mare, de 5 000 mg/kg greutate corporală (a se vedea apendicele 2). Din motive de bunăstare animală, testarea pe animale a substanțelor din categoria 5 SGA (2 000-5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil că rezultatele acestor teste vor fi direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor, a sănătății animale sau a mediului.

1.5.3. **Testul-limită**

Testul-limită se utilizează în special în situațiile în care experimentatorul are informații care arată că este posibil ca materialul de testat să nu fie toxic, având o toxicitate puțin peste dozele-limită reglementate. Informațiile privind toxicitatea materialului de testat pot fi deduse din cunoștințele despre compuși, amestecuri și produse similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că materialul de testat este toxic, se efectuează testul principal.

Se poate efectua un test-limită cu o doză de 2 000 mg/kg greutate corporală pe șase animale (trei animale în fiecare etapă). În mod excepțional, se poate efectua un test-limită cu o doză de 5 000 mg/kg cu trei animale (a se vedea apendicele 2). Dacă intervin decese cauzate de substanța de testat, se poate dovedi necesară efectuarea de teste la următorul nivel inferior.

1.6. OBSERVAȚII

Animalele sunt observate individual după administrarea dozelor, cel puțin o dată în primele 30 de minute, periodic în primele 24 de ore, acordându-li-se o atenție specială în primele 4 ore, și, ulterior, zilnic, timp de 14 zile, cu excepția cazului în care trebuie excluse din studiu și eutanasiate din motive de bunăstare animală sau sunt găsite moarte. Cu toate acestea, perioada de observație nu se stabilește rigid. Ea se determină în funcție de reacțiile toxice și momentul declanșării acestora și de durata perioadei de recuperare și, prin urmare, poate fi prelungită, dacă este necesar. Momentele în care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere (12). Toate observațiile se înregistrează sistematic, întocmindu-se fișe individuale pentru fiecare animal.

▼B

Vor fi necesare observații suplimentare în cazul în care animalele manifestă în continuare semne de toxicitate. Observațiile vizează modificările pielii și blănii, ochilor și membranelor mucoaselor, modificările activității sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos central și vegetativ și ale activității somato-motorii și modificările de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremuratului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în *Humane Endpoints Guidance Document* (9). Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

1.6.1. **Greutatea corporală**

Animalele se cântăresc individual puțin înainte de administrarea substanței de testat și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Se calculează și se înregistrează variațiile de greutate. La sfârșitul testului, animalele care au supraviețuit sunt cântărite și apoi eutanasiate.

1.6.2. **Patologie**

Toate animalele participante la test (inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din motive de bunăstare animală) sunt supuse unei autopsii macroscopice. Se înregistrează toate modificările patologice majore intervenite la fiecare animal. Se poate efectua, de asemenea, o examinare microscopică a organelor care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore, întrucât ar putea furniza informații utile.

2. **DATE**

Se furnizează date individuale despre animale. În plus, se face un rezumat tabelar al tuturor datelor, prezentând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

3. **RAPORT**

3.1. **RAPORTUL DE TESTARE**

Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Substanța de testat:

— natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);

— date de identificare, inclusiv numărul CAS.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

Animalele de experiență:

— specie/suș utilizată;

▼B

— starea microbiologică a animalelor, dacă se cunoaște;

— numărul, vârsta și sexul animalelor (inclusiv, dacă este cazul, o justificare pentru utilizarea de masculi în locul femelelor);

— sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;

Condiții de testare:

— detalii privind prepararea substanței de testat, inclusiv detalii privind forma fizică a materialului administrat;

— detalii privind administrarea substanței de testat, inclusiv volumul dozelor și durata administrării;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa hranei, sursa apei);

— o justificare pentru selectarea dozei inițiale.

Rezultate:

— un tabel cu datele privind reacția și nivelul dozei la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitate, natura, gravitatea și durata efectelor);

— un tabel cu greutatea corporală și variațiile acesteia;

— greutatea fiecărui animal în ziua administrării dozei, la intervale săptămânale ulterior și în momentul morții sau al sacrificării;

— data și ora morții, dacă a survenit înainte de momentul planificat pentru sacrificare;

— graficul declanșării semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;

— concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

3. Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

4. Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

5. Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134

6. Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

7. Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

8. OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

9. OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

10. OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

11. Lipnick R L, Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995), Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

12. Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

ANEXA 1

PROCEDURA DE URMAT PENTRU FIECARE DOZĂ INIȚIALĂ

OBSERVAȚII GENERALE

Pentru fiecare doză inițială, trebuie urmate diferitele scheme de testare, în conformitate cu cele prezentate în prezentul apendice.

— Apendicele 1a: doza inițială este de 5 mg/kg de greutate corporală

— Apendicele 1b: doza inițială este de 50 mg/kg de greutate corporală

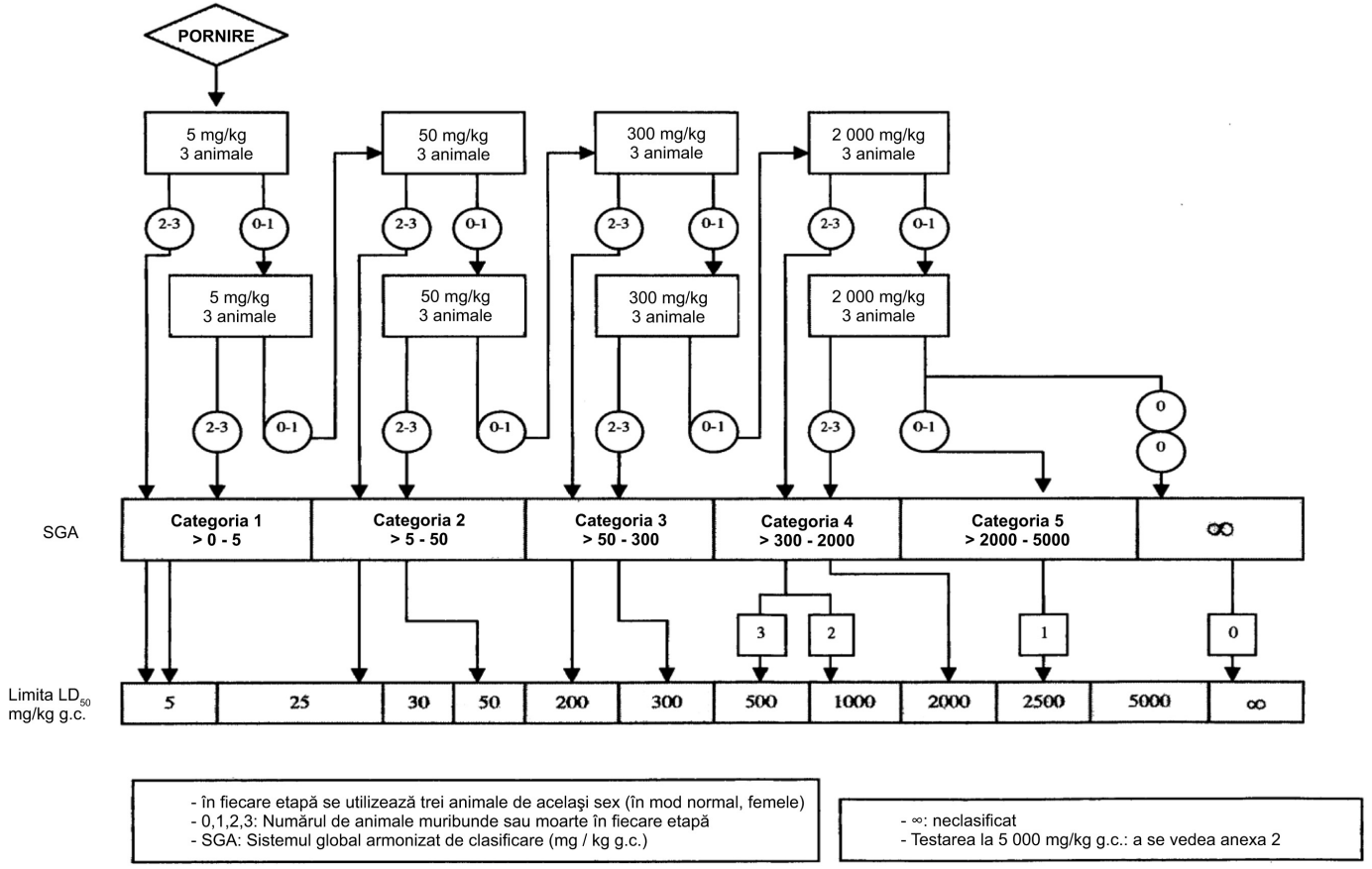
— Apendicele 1c: doza inițială este de 300 mg/kg de greutate corporală

— Apendicele 1d: doza inițială este de 2 000 mg/kg de greutate corporală

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

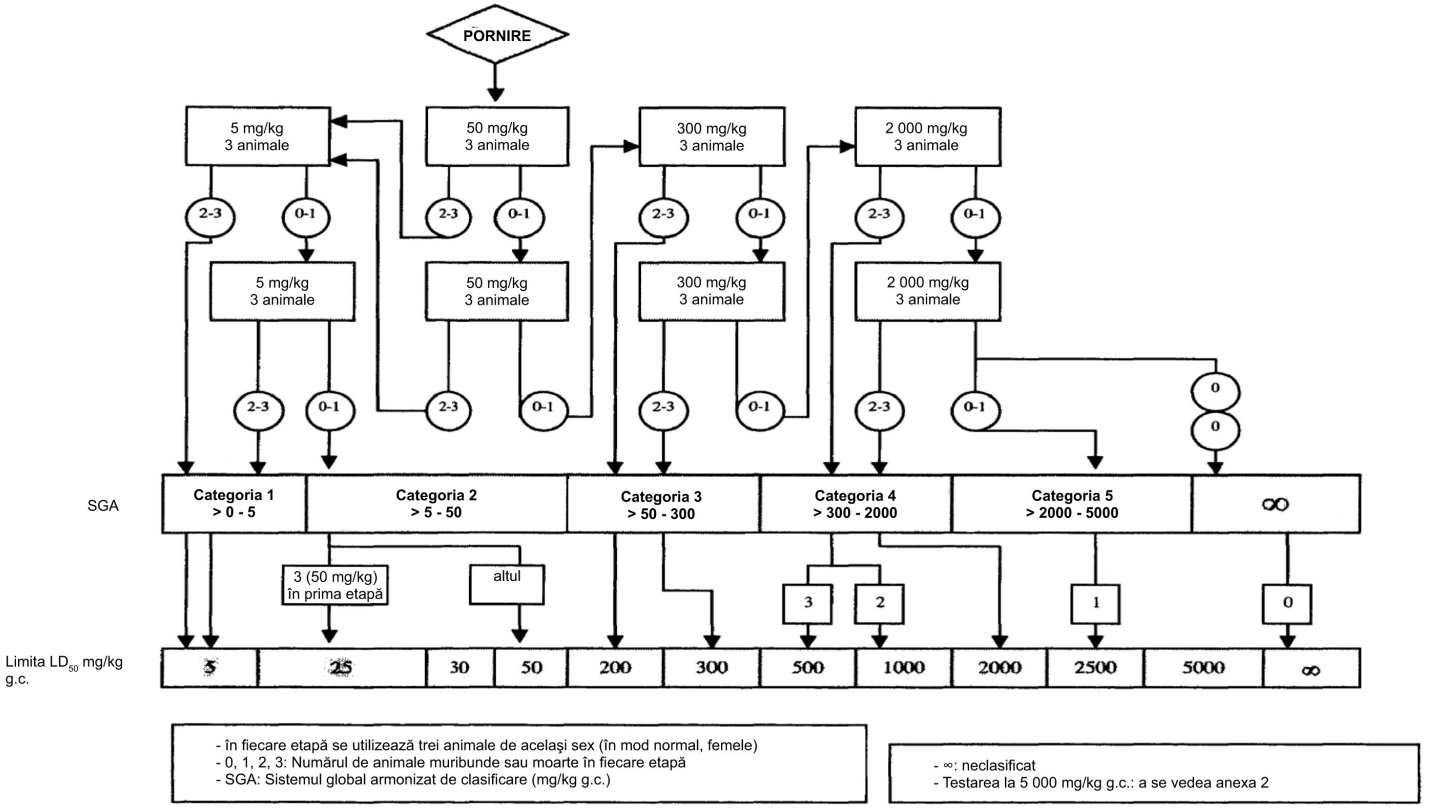
APENDICELE 1A

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ INIȚIALĂ DE 5 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



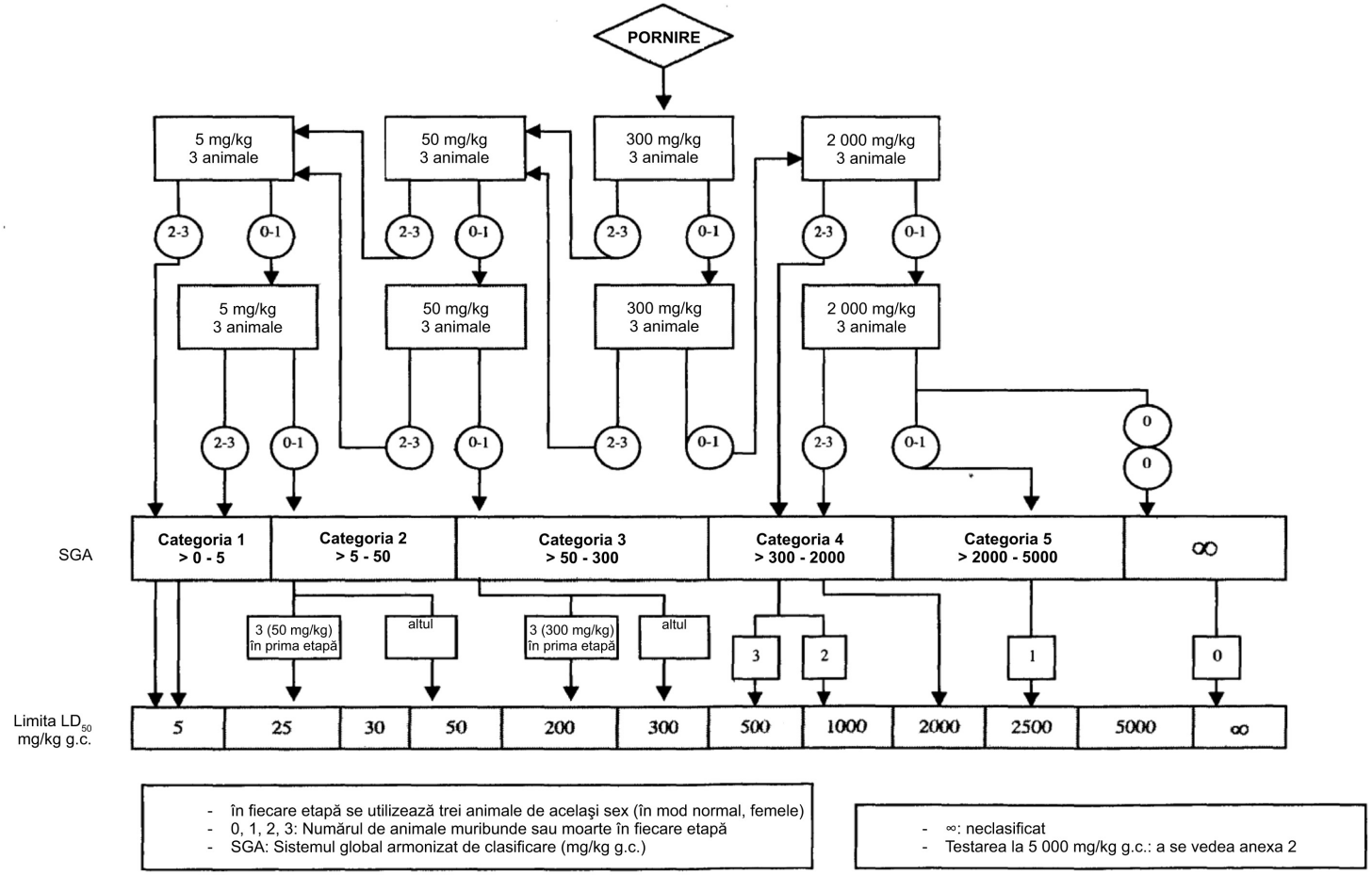
APENDICELE 1B

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ INIȚIALĂ DE 50 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



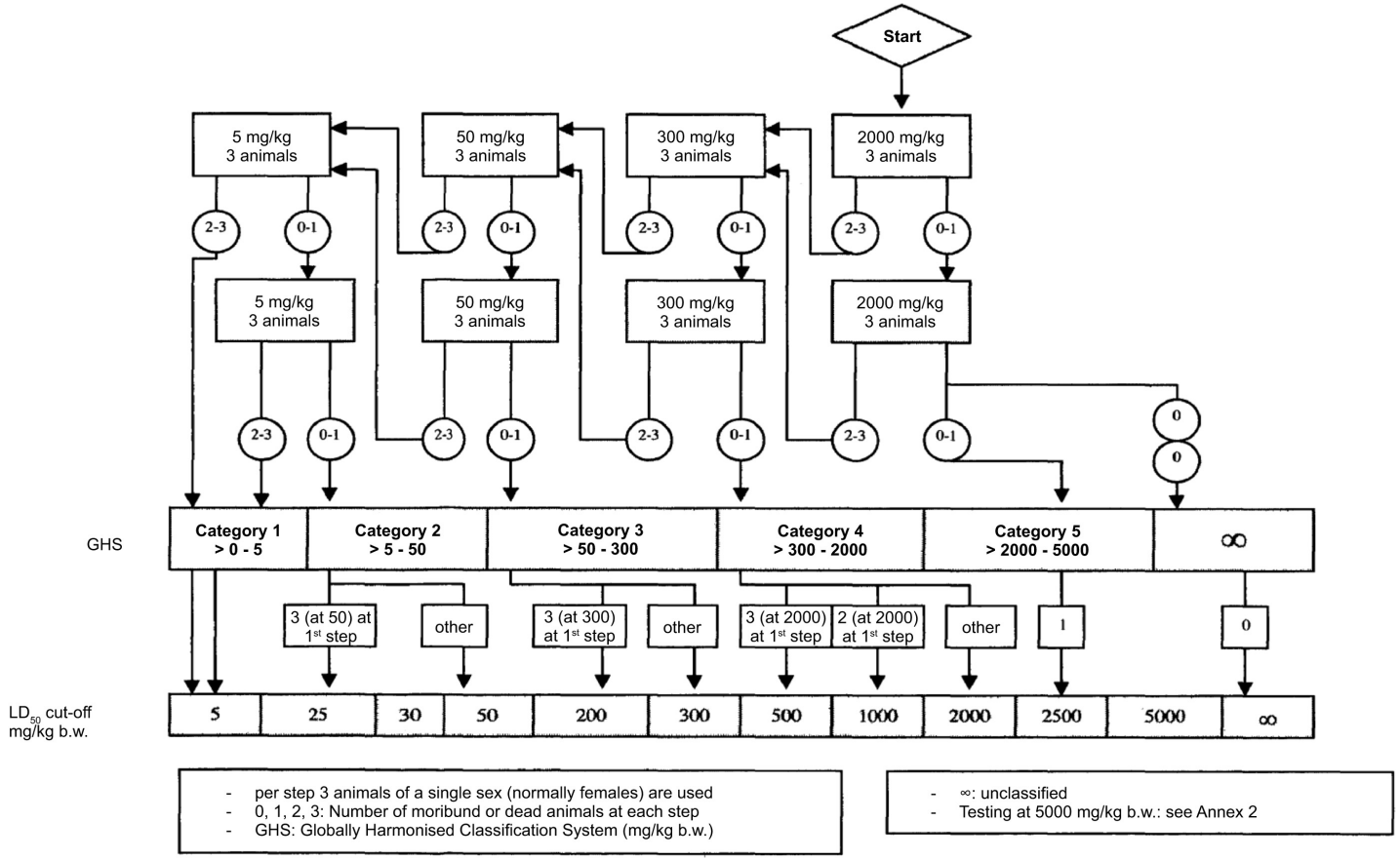
APENDICELE 1C

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ INIȚIALĂ DE 300 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



APENDICELE 1D

PROCEDURA DE TESTARE CU O DOZĂ INIȚIALĂ DE 2 000 MG/KG GREUTATE CORPORALĂ



▼B

APENDICELE 2

CRITERIILE PENTRU CLASIFICAREA SUBSTANȚELOR DE TESTAT CU VALORI ESTIMATE ALE LD_{50} DE PESTE 2 000 MG/KG FĂRĂ A FI NECESARĂ TESTAREA

Criteriile pentru categoria de periculozitate 5 au ca scop să permită identificarea substanțelor de testat care prezintă un pericol relativ scăzut de toxicitate acută dar care, în anumite circumstanțe, pot prezenta pericole pentru populațiile vulnerabile. Se anticipează că aceste substanțe au o LD_{50} orală sau dermică între 2 000 și 5 000 mg/kg sau doze echivalente pentru alte căi. Substanța de testat se clasifică în categoria de periculozitate definită prin: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 din SGA) în următoarele cazuri:

(a) dacă este încadrată în această categorie de oricare dintre diagramele de testare din anexele 1a-1d, pe baza incidenței deceselor;

(b) dacă sunt deja disponibile date fiabile care arată că LD_{50} se situează în limitele categoriei 5 sau alte studii pe animale sau privind efectele toxice asupra oamenilor indică o problemă acută pentru sănătatea oamenilor;

(c) prin extrapolare, estimare sau măsurarea de date, dacă nu se justifică clasificarea într-o clasă de periculozitate mai mare și

— sunt disponibile informații fiabile privind efectele toxice semnificative asupra oamenilor; sau

— se observă decese la testarea până la valorile din categoria 4 pe cale orală; sau

— dacă concluziile unor experți confirmă semne clinice semnificative de toxicitate, la testarea până la valorile din categoria 4, cu excepția diareii, piloerecției sau a aspectului neîngrijit; sau

— dacă concluziile experților confirmă informații fiabile care indică potențiale efecte acute semnificative conform altor studii asupra animalelor.

TESTAREA CU DOZE PESTE 2 000 MG/KG

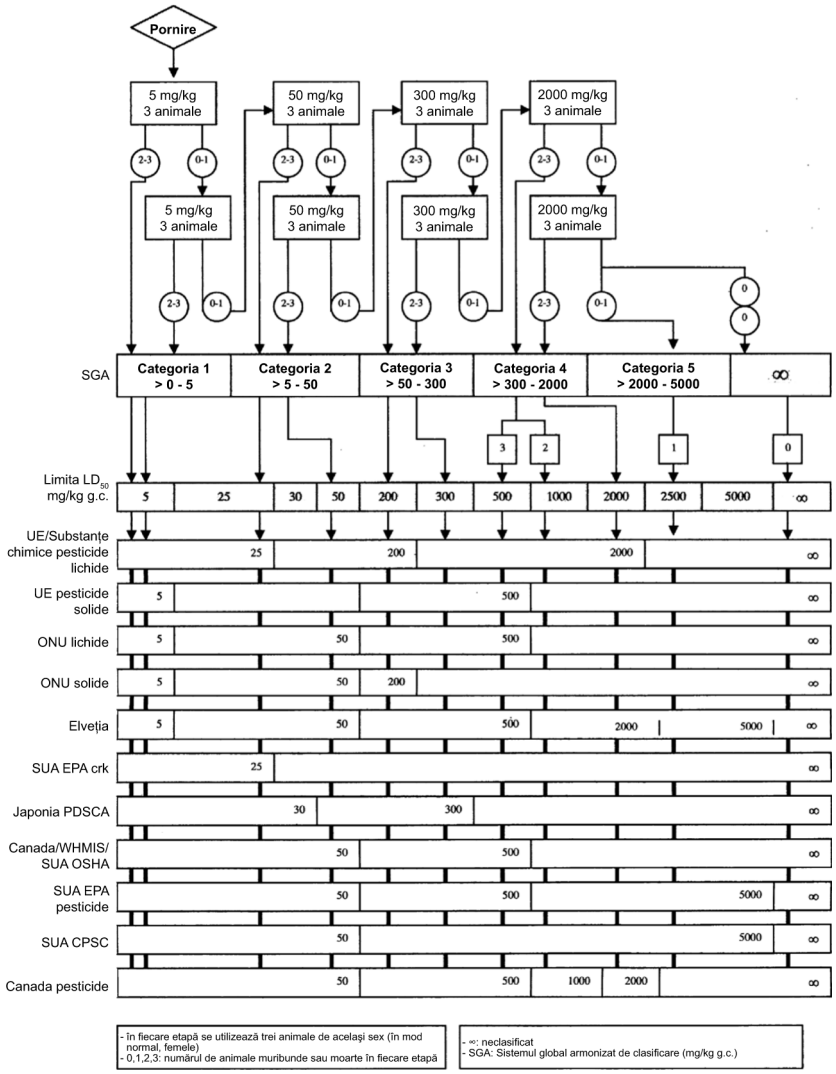
Recunoscând necesitatea de a proteja bunăstarea animală, testarea pe animale în limitele categoriei 5 (5 000 mg/kg) este descurajată și se ia în considerare doar în cazul în care este foarte probabil că rezultatele acestor teste vor fi direct relevante pentru protecția sănătății oamenilor și a sănătății animale (10). Nu se efectuează alte teste cu doze mai mari.

Când se impune testarea cu o doză de 5 000 mg/kg, este necesară o singură etapă (trei animale). Dacă primul animal tratat moare, testul continuă cu administrarea dozei de 2 000 mg/kg, în conformitate cu diagramele din apendicele 1. Dacă primul animal supraviețuiește, se administrează aceeași doză altor două animale. Dacă doar unul dintre cele trei animale moare, valoarea LD_{50} este estimată la peste 5 000 mg/kg. Dacă mor două animale, se continuă procedura de administrare cu 2 000 mg/kg.

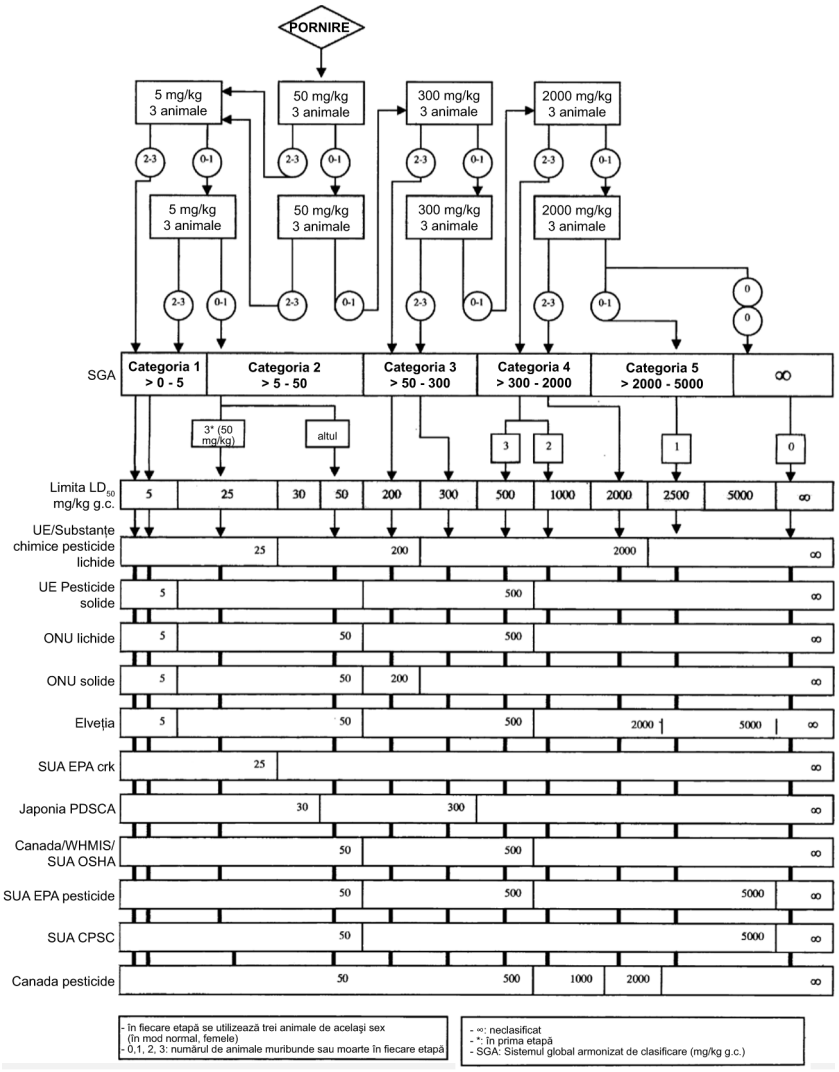
▼B

APENDICELE 3

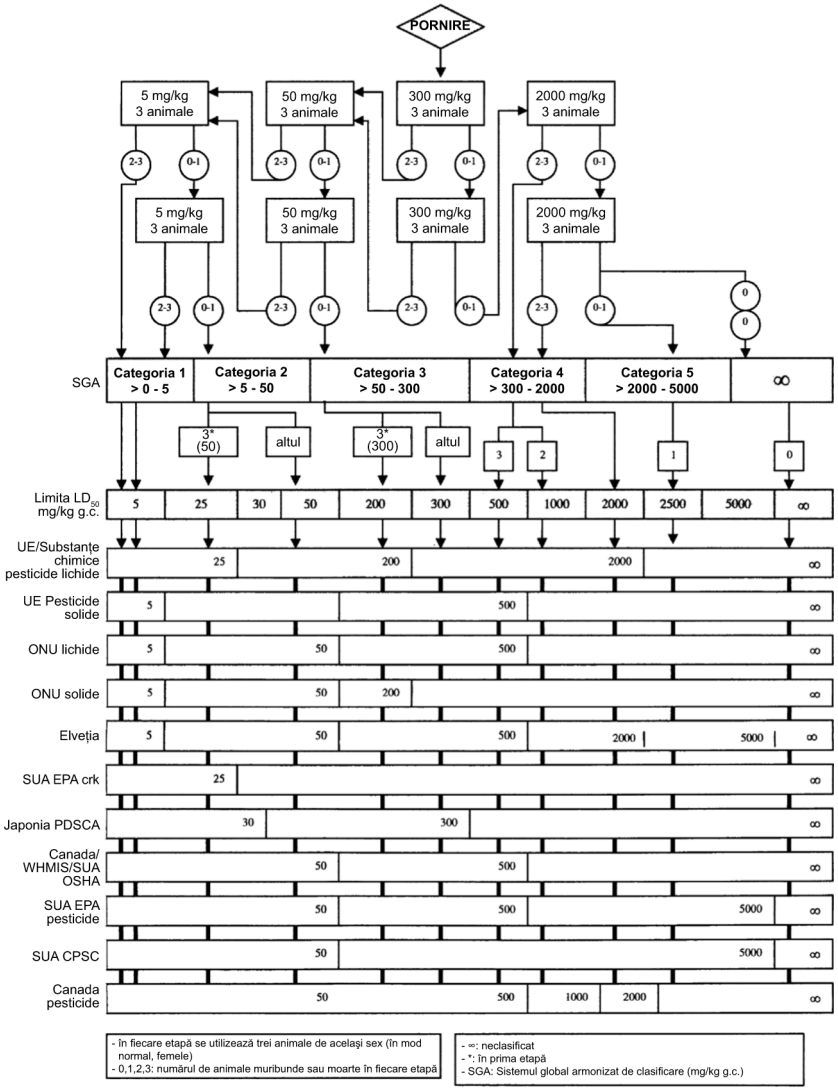
METODA DE TESTARE B.1 tris Indicații pentru clasificarea conform sistemului UE pentru perioada de tranziție până la punerea completă în aplicare a Sistemului global armonizat de clasificare (SGA) (preluate din referința 8)



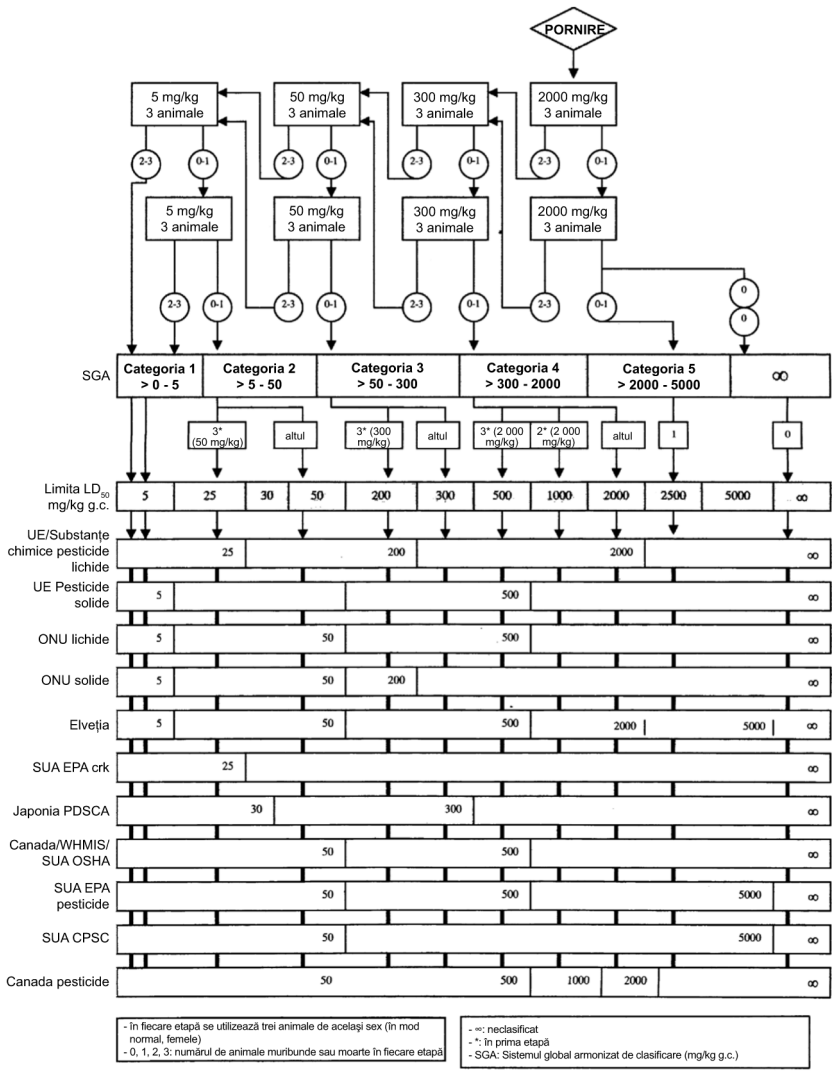
▼B


PORNIRE
5 mg/kg 3 animale
50 mg/kg 3 animale
300 mg/kg 3 animale
2000 mg/kg 3 animale
2-3
0-1
0
SGA
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50 mg/kg)
altul
Limita LD50 mg/kg g.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/Substanțe chimice pesticide lichide
UE Pesticide solide
ONU lichide
ONU solide
Elveția
SUA EPA crk
Japonia PDSCA
Canada/WHMIS/ SUA OSHA
SUA EPA pesticide
SUA CPSC
Canada pesticide
- În fiecare etapă se utilizează trei animale de același sex (în mod normal, femele)
- 0,1, 2, 3: numărul de animale muribunde sau moarte în fiecare etapă
- ∞: neclasificat
- *: în prima etapă
- SGA: Sistemul global armonizat de clasificare (mg/kg g.c.)

▼B


PORNIRE
5 mg/kg 3 animale
50 mg/kg 3 animale
300 mg/kg 3 animale
2000 mg/kg 3 animale
2-3
0-1
0
SGA
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50)
altul
3* (300)
3
2
1
Limita LD50 mg/kg g.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/Substanțe chimice pesticide lichide
UE Pesticide solide
ONU lichide
ONU solide
Elveția
SUA EPA crk
Japonia PDSCA
Canada/ WHMIS/SUA OSHA
SUA EPA pesticide
SUA CPSC
Canada pesticide
- în fiecare etapă se utilizează trei animale de acelaşi sex (în mod normal, femele)
- 0,1,2,3: numărul de animale muribunde sau moarte în fiecare etapă
- ∞: neclasificat
- *: în prima etapă
- SGA: Sistemul global armonizat de clasificare (mg/kg g.c.)

▼B


PORNIRE
5 mg/kg 3 animale
50 mg/kg 3 animale
300 mg/kg 3 animale
2000 mg/kg 3 animale
2-3
0-1
0
SGA
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (50 mg/kg)
altul
3* (300 mg/kg)
3* (2 000 mg/kg)
2* (2 000 mg/kg)
1
Limita LD50 mg/kg g.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/Substanțe chimice pesticide lichide
UE Pesticide solide
ONU lichide
ONU solide
Elveția
SUA EPA crk
Japonia PDSCA
Canada/WHMIS/ SUA OSHA
SUA EPA pesticide
SUA CPSC
Canada pesticide
- În fiecare etapă se utilizează trei animale de acelaşi sex (în mod normal, femele)
- 0, 1, 2, 3: numărul de animale muribunde sau moarte în fiecare etapă
- ∞: neclasificat
- *: în prima etapă
- SGA: Sistemul global armonizat de clasificare (mg/kg g.c.)

▼M4

B.2. TOXICITATEA ACUTĂ PRIN INHALARE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 403 (2009) a OCDE (1). Versiunea originală a Orientării 403 privind testarea toxicității acute prin inhalare a fost adoptată în 1981. Această metodă de testare B.2 revizuită (ca echivalent al Orientării 403 revizuite) a fost concepută pentru a fi mai flexibilă, pentru reducerea gradului de utilizare a animalelor și pentru satisfacerea cerințelor de reglementare. Metoda de testare revizuită prezintă două tipuri de studii: un protocol tradițional LC_{50} și un protocol concentrație × timp (C × t). Caracteristicile principale ale acestei metode de testare sunt capacitatea de a oferi o relație concentrație-răspuns de la rezultate non-letale la letale, pentru a obține concentrația letală medie (LC_50), concentrația non-letală limită (de exemplu, LC_01) și panta, precum și capacitatea de a identifica o posibilă susceptibilitate în funcție de sex. Protocolul C × t trebuie să fie folosit în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică ce impune testarea pe animale pe mai multe perioade de timp, cum ar fi pentru planificarea reacției de urgență [de exemplu, determinarea nivelurilor orientative de expunere acută (AEGL), orientările privind planificarea reacției de urgență (ERPG) sau nivelurile-limită de expunere acută (AETL)] sau pentru planificarea folosirii terenurilor.

2. Orientări privind desfășurarea și interpretarea studiilor în legătură cu această metodă de testare se pot găsi în ghidul privind testarea toxicității acute prin inhalare (Ghidul 39) (2).

3. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la finele acestui capitol și în Ghidul 39 (2).

4. Această metodă de testare permite caracterizarea substanței chimice testate și evaluarea cantitativă a riscurilor și permite ordonarea și clasificarea substanțelor chimice testate în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (3). Ghidul 39 (2) prezintă orientări în alegerea metodei de testare corespunzătoare pentru testarea toxicității acute. În cazul în care sunt necesare doar informații privind clasificarea și etichetarea, se recomandă în general capitolul B.52 din prezenta anexă (4) [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Această metodă de testare B.2 nu este destinată în mod specific testării unor materiale specializate, cum ar fi compuși izometrici puțin solubili sau materiale fibroase sau nanomateriale artificiale.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Înainte de a lua în considerare testarea în conformitate cu această metodă de testare, laboratorul care efectuează testele trebuie să țină seama de toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, inclusiv studiile existente [de exemplu, capitolul B.52 din prezenta anexă (4)] ale căror date ar susține neefectuarea unor testări suplimentare, pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate specii, sușe, sexe, moduri de expunere și concentrații de testare corespunzătoare includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizările anticipate și potențialul de expunere umană; datele (Q)SAR disponibile și datele toxicologice privind substanțele cu structură apropiată [a se vedea Ghidul 39 (2)].

▼M4

6. Se evită, în măsura în care este posibil, testarea substanțelor chimice corozive și/sau iritante la concentrații despre care se anticipează că produc durere și/sau suferință gravă. Potențialul corosiv/iritant se evaluează pe baza experienței, folosind dovezi cum ar fi experiența la oameni și la animale (de exemplu, din studii cu doză repetată efectuate la concentrații necorozive/neiritante), date existente *in vitro* [de exemplu, din capitolele B.40, (5), B.40bis (6) din prezenta anexă sau din Orientarea 435 a OCDE (7)], valori ale pH-ului, informații privind substanțe similare sau orice date pertinente, pentru a investiga posibilitatea de a renunța la alte testări. Pentru cerințe de reglementare specifice (de exemplu, pentru planificare în situații de urgență), această metodă de testare se poate folosi pentru expunerea animalelor la aceste materiale, deoarece permite conducătorului studiului sau investigatorului principal să dețină controlul asupra alegerii concentrațiilor țintă. Cu toate acestea, concentrațiile vizate nu trebuie să inducă efecte iritante/corozive grave, dar trebuie să fie suficient de mari pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt alese în mod individualizat și se prezintă justificarea pentru alegerea concentrației [a se vedea Ghidul 39 (2)].

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Această metodă de testare revizuită B.2 a fost concepută în vederea obținerii de informații suficiente privind toxicitatea acută a unei substanțe chimice testate pentru a permite clasificarea sa și pentru a furniza date privind caracterul letal (de exemplu, $LC_{50,}$ LC_{01} și panta) pentru unul sau ambele sexe, așa cum este necesar pentru evaluările cantitative ale riscului. Această metodă de testare oferă două metode. Prima metodă este un protocol tradițional în care grupuri de animale sunt expuse unei concentrații-limită (test la valori-limită) sau unei serii de concentrații în cadrul unei proceduri secvențiale, pe o durată predeterminată, de obicei de 4 ore. Alte durate de expunere se pot aplica pentru scopuri de reglementare specifice. A doua metodă este un protocol de tip ($C \times t$), în cadrul căruia grupuri de animale sunt expuse unei concentrații (limită) sau unei serii de concentrații multiple pentru durate multiple.

8. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor la fel ca animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul Ghidului OCDE nr. 19 privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (8).

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

9. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușe folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul, iar în cazul în care se utilizează alte specii alegerea trebuie să fie justificată.

Pregătirea animalelor

10. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua expunerii, animalele trebuie să fie adulți tineri în vârstă de 8 până la 12 săptămâni, iar greutatea lor corporală trebuie să fie în limita ± 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex a tuturor animalelor expuse anterior, de aceeași vârstă. Animalele sunt selectate aleatoriu și marcate pentru identificare individuală. Animalele se țin în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator. De asemenea, animalele trebuie să fie aclimatizate la aparatul de testare pentru o scurtă perioadă înainte de testare, deoarece astfel se va reduce stresul produs prin introducerea în noul mediu.

▼M4

Îngrijirea animalelor

11. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă trebuie să fie menținută, în mod ideal, în intervalul 30 până la 70 %, deși acest lucru poate să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri, animalele sunt închise în cuști în grupuri, în funcție de sex și de concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele urmează să fie expuse doar în zona nasului, ar putea fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau de imobilizare. Imobilizarea poate influența efecte fiziologice cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator. În cazul în care sunt disponibile date generice care demonstrează că nu se produc asemenea modificări într-o măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea preliminară la tuburile de imobilizare. Animalele la care întregul corp este expus unui aerosol sunt ținute în cuști individuale în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare de laborator, convenționale și certificate, cu excepția perioadei de expunere, împreună cu o cantitate nelimitată de apă potabilă din rețeaua municipală. Iluminatul este artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

Incinte de inhalare

12. La selectarea unei incinte de inhalare se iau în considerare natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). Expunerea doar în zona nasului este preferată, în general, pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere a întregului corp, dar această metodă trebuie să fie justificată în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, volumul total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și expunere a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor specifice sunt descrise în Ghidul 39 (2).

CONDIȚII DE EXPUNERE

Administrarea concentrațiilor

13. La șobolani, expunerile doar în zona nasului pot avea orice durată până la 6 ore. În cazul în care șoarecii sunt expuși doar în zona nasului, expunerile nu trebuie să depășească, în general, 4 ore. În cazul în care sunt necesare studii pe durată mai mare, trebuie să se prezinte o justificare [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Animalele expuse la aerosoli în incinte destinate expunerii întregului corp sunt ținute în cuști separate, pentru a preveni ingestia substanței testate prin îngrijirea corporală a altor animale din cușcă. Hrănirea se sistează pe durata expunerii. În timpul expunerii prin intermediul întregului corp se poate asigura apa.

14. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosol sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, concentrația aleasă și/sau forma fizică cea mai probabilă în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele chimice higroscopice și reactive din punct de vedere chimic se testează în condiții de aer uscat. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita generarea de concentrații explozive.

▼M4

Distribuția granulometrică

15. Determinarea granulometriei se efectuează pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) între 1 și 4 μm, cu o abatere standard geometrică (σ_g) în intervalul 1,5-3,0 (2) (9) (10). Deși trebuie să se depună un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, în cazul în care acest lucru nu este posibil trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, vaporii de metale pot fi sub acest standard iar particulele cu sarcină electrică, fibrele și materialele higroscopice (a căror dimensiune crește în mediul umed din căile respiratorii) pot depăși acest standard.

Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul

16. Se poate folosi un vehicul pentru a genera valori adecvate ale concentrației substanței chimice testate în atmosferă și ale granulometriei. Ca regulă, se preferă apa. Particulele în suspensie pot fi supuse unor procese mecanice pentru a atinge granulometria necesară, dar se iau măsuri pentru a evita descompunerea sau alterarea substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au alterat compoziția chimică a substanței chimice testate (de exemplu, temperaturi extreme datorate frecării în timpul măcinării excesive), se verifică analitic compoziția substanței chimice testate. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita contaminarea substanței chimice testate. Nu este necesară testarea materialelor granulare nefriabile care sunt formulate pentru a nu fi inhalabile. Se folosește un test de atriție pentru a demonstra că nu se produc particule respirabile la manipularea materialului granular. În cazul în care testul de atriție conduce la formarea de substanțe respirabile, se efectuează un test de toxicitate prin inhalare.

Animale din grupul martor

17. Nu este necesar un grup martor negativ (aer) studiat în paralel. Atunci când se folosește un alt vehicul decât apa pentru generarea atmosferei de testare, se folosește un grup martor pentru vehicul doar dacă nu sunt disponibile date istorice privind toxicitatea prin inhalare. În cazul în care un studiu de toxicitate a unei substanțe chimice de testare formulate într-un vehicul nu indică nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată; astfel încât nu este necesar un vehicul martor.

MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE

Debitul de aer în incintă

18. Debitul de aer prin cameră trebuie să fie controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea concentrației (sau stabilității) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de control al parametrilor relevanți pentru generarea atmosferei dinamice. Trebuie să se acorde o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte destinate expunerii doar în zona nasului, în cazurile în care debitul de aer prin sistemul de expunere este inadecvat pentru a asigura un flux dinamic al atmosferei ce conține substanța chimică testată. Există metodologii recomandate care se pot folosi pentru a demonstra că nu se produce reinhalarea în condițiile de lucru alese (2) (11). Concentrația de oxigen trebuie să fie de minimum 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se pot atinge aceste standarde, se măsoară concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon.

▼M4

Temperatura și umiditatea relativă în incintă

19. Temperatura incintei se menține la 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă în zona în care respiră animalele, atât la expunerea în zona nasului, cât și a întregului corp, se monitorizează și se înregistrează de cel puțin trei ori pentru durate de până la 4 ore și orar, pentru durate mai scurte. În mod ideal, umiditatea relativă trebuie să fie menținută în intervalul 30-70 % dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

Substanța chimică testată: concentrația nominală

20. Când este posibil, se calculează și se înregistrează concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală este masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este folosită pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

Substanța chimică testată: concentrația efectivă

21. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie să fie susținută prin caracterizările specifice ale substanței chimice testate din studii preliminare. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponente se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în acest caz, sunt necesare date analitice care demonstrează similaritatea între compoziția materialului în suspensie în aer și cea a materialului inițial. În cazul în care aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară reanalizarea substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer) la intervale regulate, pe parcursul studiului. Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă. Concentrațiile-țintă nominale și efective se prezintă în raportul de studiu, dar numai concentrațiile efective se folosesc în analizele statistice pentru a calcula valorile concentrației letale.

22. Se folosește un lot de substanță chimică testată, dacă este posibil, iar proba testată se păstrează în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței testate, inclusiv puritatea sa și, dacă este realizabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără a se limita la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară rezultată în urma analizelor de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei de testare nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu, culoare, natura fizică etc.).

23. Atmosfera de expunere se menține cât mai constantă posibil și se monitorizează continuu și/sau intermitent, în funcție de metoda de analiză. Atunci când se folosește prelevarea intermitentă, probele de atmosferă din incintă se prelevează cel puțin de două ori în cadrul unui studiu de patru ore. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. Dacă apar fluctuații accentuate de la o probă la alta, la următoarele concentrații testate se utilizează patru probe pentru fiecare expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu trebuie să se abată de la

▼M4

concentrația medie cu mai mult de ± 10 % pentru gaze și vapori sau ± 20 % pentru aerosolii cu lichide sau solide. Se calculează și se consemnează timpul necesar pentru echilibrarea incintei (t_{95}). Durata unei expuneri acoperă timpul în care este generată substanța chimică testată și aceasta ia în considerare perioadele necesare pentru a se atinge t_{95}. Orientări privind estimarea t_{95} pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

24. Pentru amestecuri foarte complexe, constând în gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice de testare propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), este posibil ca fiecare fază să se comporte diferit într-o incintă de inhalare, astfel încât trebuie să se selecteze cel puțin o substanță indicatoare (analit), în mod normal substanța activă principală din amestec, pentru fiecare fază (gaz/vapori și aerosoli). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, se consemnează concentrația analitică pentru amestec și nu doar pentru substanța activă sau componentul activ (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

Substanța chimică testată: distribuția granulometrică

25. Distribuția granulometrică a aerosolilor se determină cel puțin de două ori în timpul fiecărei expuneri de 4 ore, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de determinare a granulometriei. În cazul în care se obțin rezultate echivalente cu impactorul în cascadă și cu un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/barbotor de gaze, se folosește în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometriei trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, se iau măsuri de minimizare a datelor neconcludente, care pot duce la necesitatea de a repeta o expunere. Determinarea granulometriei se face pentru vapori dacă există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule într-o atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte (a se vedea punctul 15).

PROCEDURĂ

26. În continuare sunt descrise două tipuri de studii: protocolul tradițional și protocolul C × t. Ambele protocoale pot include un studiu de observare, un studiu principal și/sau un test la valori-limită (protocolul tradițional) sau testarea la o concentrație-limită (C × t). Atunci când se știe că un sex este mai receptiv, conducătorul studiului poate alege să efectueze studiile folosind doar sexul receptiv. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. Înainte de a începe, se iau în considerare toate datele disponibile, pentru a minimiza utilizarea animalelor. De exemplu, datele generate folosind capitolul B.52 din prezenta anexă (4) pot elimina necesitatea unui studiu de observare și, de asemenea, pot demonstra dacă un sex este mai receptiv [a se vedea Ghidul 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLUL TRADIȚIONAL

Considerații generale: protocolul tradițional

27. În cadrul unui studiu tradițional, grupurile de animale sunt expuse la o substanță chimică de testare pentru o perioadă fixă (în general, 4 ore) într-o incintă de expunere în zona nasului sau a întregului corp. Animalele sunt expuse la o concentrație-limită (test la valori-limită) sau la minimum trei concentrații într-o procedură secvențială (studiu principal). Studiul principal poate fi precedat de un studiu de observare, în afara cazului în care există deja unele informații privind substanța chimică testată, de exemplu un studiu B.52 anterior [a se vedea Ghidul 39 (2)].

Studiul de observare: protocolul tradițional

28. Un studiu de observare se folosește pentru a estima tăria substanței chimice testate, pentru a indica diferențe de receptivitate între sexe și pentru a ajuta la selectarea nivelurilor de concentrație de expunere pentru studiul principal sau testul la valori-limită. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de observare, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv date (Q)SAR și date pentru substanțe chimice similare. Nu se vor expune mai mult de trei masculi și trei femele la fiecare concentrație (pot fi necesare 3 animale/sex, pentru a stabili o diferență între sexe). Un studiu de observare poate consta într-o singură concentrație, dar se pot testa mai multe concentrații, dacă este necesar. Un studiu de observare nu trebuie să implice la fel de multe animale și concentrații ca în cazul unui studiu principal. În schimb, se poate folosi un studiu B.52 efectuat anterior (4) în locul unui studiu de observare [a se vedea Ghidul 39 (2)].

Testul la valori-limită: protocolul tradițional

29. Se folosește un test la valori-limită atunci când substanța chimică testată este cunoscută sau anticipată ca fiind practic netoxică, adică generând un răspuns toxic doar peste limita de concentrație reglementată. În cadrul unui test la valori-limită, un singur grup de trei masculi și trei femele este expus la substanța chimică testată la o concentrație-limită. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate pot fi deduse din cunoștințele despre substanțe testate similare, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea sau atunci când se estimează că substanța testată este toxică, se efectuează testul principal.

30. De obicei, selectarea concentrațiilor-limită depinde de cerințele de reglementare. În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l (sau concentrația maximă realizabilă) (3). Din punct de vedere tehnic, poate fi dificilă generarea concentrațiilor-limită la unele substanțe chimice testate, în special la cele sub formă de vapori sau aerosoli. La testarea aerosolilor, obiectivul principal este atingerea unei dimensiuni respirabile a particulelor (DAMM de 1-4 μm). Acest lucru este posibil pentru majoritatea substanțelor chimice testate la o concentrație de 2 mg/l. Testarea aerosolilor la o concentrație mai mare de 2 mg/l este încercată doar în cazul în care se poate atinge o dimensiune respirabilă a particulelor [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 descurajează testarea peste concentrația-limită, din motive care țin de bunăstarea animalelor (3). Concentrația-limită este luată în considerare doar atunci când există o probabilitate mare ca rezultatele unui asemenea test să aibă relevanță directă pentru protejarea sănătății umane (3) și când justificarea este prezentată în raportul de studiu. În cazul unor substanțe de testare potențial explozive, trebuie să se ia măsuri pentru a evita condițiile favorabile unei explozii. Pentru a evita o utilizare inutilă a animalelor, se efectuează un rând de teste fără animale înainte de testul la valori-limită, pentru a asigura că în incintă se pot atinge condițiile necesare pentru un test la valori-limită.

▼M4

31. În cazul în care se observă cazuri de deces sau agonie la concentrația-limită, rezultatele testului la valori-limită pot servi ca studiu de observare pentru testarea ulterioară la alte concentrații (a se vedea studiul principal). Atunci când proprietățile fizice sau chimice ale unei substanțe chimice testate fac imposibilă atingerea unei concentrații limită, se testează concentrația maximă realizabilă. În cazul în care se atinge o mortalitate sub 50 % la concentrația maximă realizabilă, nu este necesară testarea suplimentară. Atunci când nu se poate atinge concentrația-limită, raportul de studiu trebuie să prezinte o explicație și date doveditoare. În cazul în care concentrația maximă realizabilă a unor vapori nu conduce la toxicitate, poate fi necesar ca substanța chimică testată să fie generată ca aerosol lichid.

Studiul principal: protocolul tradițional

32. De obicei, un studiu principal este efectuat cu cinci masculi și cinci femele (sau cinci animale din sexul receptiv, dacă acesta este cunoscut) pentru fiecare nivel de concentrație, cu cel puțin trei niveluri de concentrație. Pentru a obține o analiză statistică credibilă, trebuie să se folosească suficiente niveluri de concentrație. Intervalul de timp dintre grupurile de expunere se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există un nivel rezonabil de încredere privind supraviețuirea animalelor testate anterior. Acest lucru permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația-țintă pentru următorul grup de expunere. Din cauza dependenței de tehnologii complexe, această metodă poate să nu fie întotdeauna practică în studiile de inhalare, astfel încât expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație trebuie să se bazeze pe experiența anterioară și pe judecata științifică. La testarea amestecurilor trebuie consultat Ghidul 39 (2).

PROTOCOLUL CONCENTRAȚIE × TIMP (C × T)

Considerații generale: protocolul C × t

33. Un studiu secvențial după protocolul C × t poate fi luat în considerare ca alternativă la protocolul tradițional pentru evaluarea toxicității prin inhalare (12) (13) (14). Această abordare permite expunerea animalelor la o substanță chimică testată la mai multe niveluri de concentrație și pentru durate multiple. Întreaga testare este efectuată într-o incintă pentru expunere doar în zona nasului (incintele pentru întregul corp nu sunt practice pentru acest protocol). O diagramă din apendicele 1 ilustrează acest protocol. O analiză de simulare a arătat că atât protocolul tradițional cât și protocolul C × t pot conduce la valori LC_{50} de încredere, dar protocolul C × t este, în general, mai potrivit pentru obținerea unor valori de încredere pentru LC_{01} și LC_{10} (15).

34. O analiză de simulare a demonstrat că folosirea a două animale pentru fiecare interval C × t (unul din fiecare sex, atunci când se folosesc ambele sexe, sau două din sexul mai receptiv) poate fi, în general, adecvată pentru testarea a 4 concentrații și 5 durate de expunere într-un studiu principal. În anumite circumstanțe, conducătorul studiului poate alege să folosească doi șobolani din fiecare sex, pentru fiecare interval C × t (15). Utilizarea a 2 animale din fiecare sex și pentru fiecare punct de concentrație/timp poate reduce dezechilibrul și variabilitatea estimărilor, poate crește rata de succes a estimării și îmbunătăți acoperirea intervalului de încredere. Cu toate acestea, în cazul unei corespondențe insuficient de strânse cu datele pentru estimare (la utilizarea unui animal din fiecare sex sau a două animale din sexul mai receptiv) poate fi suficientă a cincea concentrație de expunere. Orientări suplimentare privind numărul de animale și concentrațiile care trebuie folosite într-un studiu C × t se pot găsi în Ghidul 39 (2).

▼M4

Studiul de observare: protocolul C × t

35. Un studiu de observare se folosește pentru a estima tăria substanței chimice testate și a ajuta la selectarea nivelurilor de concentrație de expunere pentru studiul principal. Un studiu de observare cu până la trei animale/sex/concentrație [pentru detalii, a se vedea apendicele III la Ghidul 39 (2)] poate fi necesar pentru a alege o concentrație de pornire adecvată pentru studiul principal și pentru a minimiza numărul de animale utilizate. Pentru a stabili o diferență între sexe, poate fi necesar să se folosească trei animale din fiecare sex. Aceste animale sunt expuse pe parcursul unei singure durate, în general 240 de minute. Posibilitatea de a genera atmosfere de testare corespunzătoare se evaluează în cursul testelor preliminare fără animale. În general, nu este necesar un studiu de observare dacă sunt disponibile date privind mortalitatea dintr-un studiu B.52 (4). La alegerea concentrației-țintă inițiale într-un studiu B.2, conducătorul studiului trebuie să ia în considerare modelele de mortalitate observate în orice studiu B.52 disponibil (4) pentru ambele sexe și pentru toate concentrațiile testate [a se vedea Ghidul 39 (2)].

Concentrație inițială: protocolul C × t

36. Concentrația inițială (sesiunea de expunere I) (apendicele 1) va fi o concentrație-limită sau o concentrație aleasă de conducătorul studiului pe baza studiului de observare. Grupuri de 1 animal/sex sunt expuse la această concentrație pe durate multiple (de exemplu, 15, 30, 60, 120 sau 240 de minute), rezultând un număr total de 10 animale (sesiunea de expunere I) (apendicele 1).

37. De obicei, selectarea concentrațiilor-limită depinde de cerințele de reglementare. În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l (sau concentrația maximă realizabilă) (3). Din punct de vedere tehnic, poate fi dificil să se genereze concentrații-limită la unele substanțe chimice testate, în special sub formă de vapori sau aerosoli. La testarea aerosolilor, obiectivul este atingerea unei dimensiuni respirabile a particulelor (adică DAMM de 1-4 μm) la o concentrație-limită de 2 mg/l. Acest lucru este posibil cu majoritatea substanțelor chimice testate. Testarea aerosolilor la o concentrație peste 2 mg/l trebuie încercată doar dacă se poate atinge o dimensiune respirabilă a particulelor [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 descurajează testarea peste o limită de concentrație, din motive de bunăstare a animalelor (3). Testarea peste concentrația-limită este luată în considerare atunci când există o probabilitate mare ca rezultatele unui asemenea test să aibă relevanță directă pentru protejarea sănătății umane (3) și trebuie să se prezintă justificarea în raportul de studiu. În cazul unor substanțe chimice testate potențial explozive, trebuie să se ia măsuri pentru a evita condiții favorabile unei explozii. Pentru a evita o utilizare inutilă a animalelor, se efectuează un rând de teste fără animale înainte de testarea la concentrația inițială, pentru a asigura că în incintă se pot atinge condițiile necesare pentru această concentrație.

38. În cazul în care se observă cazuri de deces sau agonie la concentrația inițială, rezultatele pentru această concentrație pot servi ca punct de plecare pentru testarea ulterioară la alte concentrații (a se vedea studiul principal). În cazul în care când proprietățile fizice sau chimice ale unei substanțe chimice testate fac imposibilă atingerea unei concentrații-limită, se testează concentrația maximă realizabilă. Atunci când mortalitatea obținută la concentrația maximă realizabilă este sub 50 %, nu este necesară testarea suplimentară. Dacă nu se poate atinge concentrația-limită, raportul de studiu trebuie să prezinte o explicație și date doveditoare. În cazul în care concentrația maximă realizabilă a unor vapori nu duce la toxicitate, poate fi necesar ca substanța chimică testată să fie generată ca aerosol lichid.

▼M4

Studiul principal: protocolul C × t

39. Concentrația inițială (sesiunea de expunere I) (apendicele 1) testată în cadrul studiului principal va fi o concentrație-limită sau o concentrație aleasă de conducătorul studiului pe baza studiului de observare. În cazul în care s-au observat cazuri de mortalitate în timpul sau după sesiunea de expunere I, expunerea minimă (C × t) care duce la mortalitate va fi luată ca indicație pentru a stabili concentrația și perioadele de expunere pentru sesiunea de expunere II. Fiecare sesiune de expunere ulterioară va depinde de sesiunea anterioară (a se vedea apendicele 1).

40. Pentru numeroase substanțe chimice testate, rezultatele obținute la concentrația inițială, împreună cu trei ședințe de expunere suplimentare cu o grilă de timp mai mică (adică distanțarea geometrică a perioadelor de expunere așa cum indică factorul dintre perioadele succesive, în general √2), vor fi suficiente pentru a stabili relația între C × t și mortalitate (15), dar poate fi benefică folosirea unei a cincea concentrații de expunere [a se vedea apendicele 1 și Ghidul 39 (2)]. Pentru interpretarea matematică a rezultatelor pentru protocolul C × t, a se vedea apendicele 1.

OBSERVAȚII

41. Animalele sunt observate clinic frecvent în timpul perioadei de expunere. După expunere, observațiile clinice se fac cel puțin de două ori în ziua expunerii sau mai frecvent dacă răspunsul animalelor la tratament indică acest lucru și cel puțin o dată pe zi după aceea, timp de 14 zile în total. Lungimea perioadei de observație nu este fixă, ci este determinată de natura și momentul de instalare a semnelor clinice și de lungimea perioadei de recuperare. Momentele de apariție și dispariție a semnelor de toxicitate sunt importante, în special în cazurile în care semnele de toxicitate au tendința de a apărea cu întârziere. Toate observațiile se consemnează sistematic, ținându-se evidențe separate pentru fiecare animal. Animalele găsite în stare muribundă și animalele care manifestă dureri mari și semne prelungite de suferință profundă sunt eutanasiate, din considerente care țin de bunăstarea animalelor. Examinările pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate trebuie să fie efectuate cu atenție, pentru ca un aspect inițial defavorabil și modificările respiratorii tranzitorii, rezultate în urma procedurii de expunere, să nu fie confundate cu toxicitatea substanței chimice testate, care ar impune eutanasierea prematură a animalelor. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în ghidul privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (Ghidul 19) (7). În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

42. Observațiile asupra animalelor în cușcă trebuie să includă modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor, activitatea sistemului respirator, sistemului circulator, sistemului nervos autonom și central, precum și activitatea somato-motorie și modelele de comportament. Acolo unde este posibil, se vor consemna orice diferențe între efectele locale și cele sistemice. Se va acorda o atenție specială observării tremuratului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi de bradipnee reflexă sau hipo/hipertermie asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate.

Greutatea corporală

43. Greutățile individuale ale animalelor sunt consemnate o dată după perioada de aclimatizare, în ziua expunerii, înainte de expunere (ziua 0) și cel puțin în zilele 1, 3 și 7 (și săptămânal după aceea), precum și la momentul morții sau eutanasierii, dacă acestea survin după ziua 1. Greutatea corporală este recunoscută ca un indicator critic al toxicității, astfel încât animalele care prezintă o reducere susținută a greutății, ≥ 20 %, comparativ cu valorile dinainte de studiu, sunt monitorizate îndeaproape. La finalul perioadei de după expunere, animalele supraviețuitoare sunt cântărite și eutanasiate.

▼M4

Patologia

44. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animală, sunt supuse unei autopsii. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce este descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se fac imediat ce este posibil, în mod normal după o zi sau două. Toate modificările patologice macroscopice sunt consemnate pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.

45. Pot fi luate în considerare examinări suplimentare incluse *a priori* în protocol, pentru extinderea valorii interpretative a studiului, de exemplu măsurarea masei pulmonare a șobolanilor supraviețuitori și/sau prezentarea unor semne de iritație, prin examinarea microscopică a căilor respiratorii. Organele examinate pot include, de asemenea, pe cele care prezintă semne de modificări patologice majore la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore și organele despre care se știe sau se anticipează că vor fi afectate. Examinarea microscopică în întregime a căilor respiratorii poate furniza informații utile privind substanțele chimice testate care reacționează cu apa, de exemplu acizii și substanțele higroscopice.

DATE ȘI RAPORT

Date

46. Pentru greutățile corporale și rezultatele autopsiei la animale se furnizează date individuale. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, prezentând, pentru fiecare grup testat, numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei.

Raportul de testare

47. Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Animale testate și îngrijirea lor

— descrierea condițiilor de ținere în cuști, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de expunere la lumină și identificarea regimului alimentar;

— specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea unei alte specii decât șobolanul;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— metodele de randomizare;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);

— descrierea oricăror condiții dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli;

▼M4

Substanța chimică testată

— natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);

— date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut;

Vehiculul

— justificarea utilizării vehiculului și justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);

— date istorice sau concurente care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului;

Incinta de inhalare

— descrierea incintei de inhalare, inclusiv dimensiunile și volumul;

— sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și generarea atmosferei;

— echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, granulometriei și concentrației efective;

— sursa de aer și tratarea aerului alimentat/extras și sistemul folosit pentru condiționare;

— metodele folosite pentru calibrarea echipamentului în vederea asigurării unei atmosfere de testare omogenă;

— diferența de presiune (pozitivă și negativă);

— orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);

— omogenitatea/stabilitatea în timp a atmosferei de testare;

— amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;

— debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (pentru expunerea întregului corp);

— informațiile privind echipamentul folosit pentru măsurarea oxigenului și dioxidului de carbon, dacă este cazul;

— timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare (t_{95})

— numărul modificărilor volumetrice pe oră;

— dispozitive de măsurare (după caz);

Datele privind expunerea

— justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;

— concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);

— concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli); fiecare poate fi analizată separat;

▼M4

— toate concentrațiile în aer sunt consemnate în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m^3 etc.); pot fi consemnate în paranteze și unități de volum (de exemplu, ppm, ppb etc.);

— distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică (σg), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Trebuie să se consemneze analizele granulometrice individuale.

Condițiile de testare

— detaliile privind prepararea substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor de materiale solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate. În cazurile în care este posibil ca procesele mecanice să fi alterat compoziția substanței chimice testate, se includ rezultatele analizelor pentru verificarea compoziției substanței chimice testate;

— o descriere (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;

— detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);

— justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare;

Rezultate

— prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;

— prezentarea sub formă tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;

— prezentarea sub formă tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și σ_g;

— prezentarea sub formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea, momentul instalării și durata efectelor);

— greutățile individuale ale animalelor, măsurate în cadrul studiului; data și ora morții, dacă au avut loc înainte de eutanasiere, momentul instalării semnelor de toxicitate și dacă acestea au fost reversibile pentru fiecare animal;

— concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;

— estimări privind mortalitatea (de exemplu, LC_{50}, LD_01), inclusiv limite de încredere de 95 % și panta (dacă sunt furnizate de metoda de evaluare);

— relația statistică, inclusiv estimarea exponentului n (protocolul C × t). Se indică denumirea programului informatic statistic;

▼M4

Discutarea și interpretarea rezultatelor

— trebuie să se acorde o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru a satisface criteriile acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;

— potențialul de inhalare a particulelor este abordat în perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot respecta criteriile privind granulometria;

— în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezentau semne de suferință gravă și prelungită, trebuie să se prezinte o explicație, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (8);

— în cazul în care testarea conform capitolului B.52 din prezenta anexă (4) a fost întreruptă în favoarea acestei metode de testare B.2, trebuie să se prezinte justificări;

— evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să includă coerența metodelor folosite la determinarea concentrațiilor nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;

— sunt tratate cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local).

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (2009), Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Disponibilă la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

(4) Capitolul B.52 din prezenta anexă, „Toxicitatea acută prin inhalare – Metoda clasei de toxicitate acută”.

(5) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)”.

(6) Capitolul B.40 bis din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testare pe un model de piele umană”.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibilă la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques (ediția a doua) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J. and Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation, Chambers. J., Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing, Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990), Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge W.F. and Zwart A. (1989), More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009), Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(16) Finney D.J. (1977), Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINIȚIE

Substanță chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

Apendicele 1

Protocolul C × t

1. Un studiu secvențial concentrație × timp (C × t) poate fi luat în considerare ca alternativă la protocolul tradițional pentru evaluarea toxicității prin inhalare (12) (13) (14). De preferință, el se aplică în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică privind testarea animalelor pe perioade multiple, de exemplu pentru planificarea reacțiilor în situații de urgență sau pentru planificarea folosirii terenurilor. Această metodă începe de obicei prin testarea la o concentrație-limită (sesiunea de expunere I), în cadrul căreia animalele sunt expuse la o substanță chimică testată pentru cinci intervale de timp (de exemplu, 15, 30, 60, 120 și 240 de minute), astfel încât se vor obține durate multiple în cadrul unei sesiuni de expunere (a se vedea figura 1). În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l. Aceste niveluri pot fi depășite doar în cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică privind testarea la aceste niveluri (a se vedea punctul 37 din textul principal al B.2).

2. În situațiile în care sunt puține informații sau nu există informații privind toxicitatea unei substanțe chimice testate, se efectuează un studiu de observare în care grupuri de maxim 3 animale din fiecare sex sunt expuse la concentrațiile-țintă selectate de conducătorul studiului, în general timp de 240 min.

3. În cazul în care se testează o concentrație-limită în cursul sesiunii de expunere I și se constată o mortalitate sub 50 %, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care există o cerință specifică de reglementare sau științifică de a stabili relația concentrație/timp/răspuns la niveluri mai mari decât concentrația-limită indicată, următoarea expunere se face la un nivel superior, de exemplu de două ori concentrația-limită (adică 2L în figura 1).

4. Dacă se observă toxicitate la concentrația-limită, este necesară testarea suplimentară (studiul principal). Aceste expuneri suplimentare se fac la concentrații inferioare (în figura 1: Sesiunile de expunere II, III sau IV') sau la concentrații superioare cu durate mai mici (în figura 1: Sesiunea de expunere IV), folosind durate care sunt adaptate și nu sunt separate de intervale atât de mari.

5. Testul (concentrația inițială și concentrațiile suplimentare) se efectuează folosind 1 animal/sex pentru fiecare punct de concentrație/timp sau 2 animale din sexul mai receptiv pentru fiecare punct de concentrație/timp. În anumite circumstanțe, conducătorul studiului poate alege să folosească doi șobolani din fiecare sex pentru fiecare punct de concentrație/timp (sau 4 animale din sexul mai receptiv pentru fiecare punct de concentrație/timp) (15). Utilizarea a 2 animale din fiecare sex pentru fiecare punct de concentrație/timp reduce dezechilibrul și variabilitatea estimărilor, crește rata de succes a estimării și îmbunătățește acoperirea intervalului de încredere privind protocolul descris aici. Detalii suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).

6. În mod ideal, fiecare sesiune de expunere este realizată într-o zi. Acest lucru oferă oportunitatea de amânare a următoarei expuneri până când există un grad de încredere rezonabil privind supraviețuirea și permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația-țintă și duratele pentru următoarea sesiune de expunere. Se recomandă să se înceapă fiecare sesiune de expunere cu grupul care va fi expus cel mai mult, de exemplu grupul de expunere de 240 de minute, urmat de grupul de expunere de 120 de minute și așa mai departe. Dacă, de exemplu, animalele din grupul de 240 de minute mor după 90 de minute sau prezintă semne de toxicitate gravă (de exemplu, modificări extreme în modelul respirator, cum ar fi respirație dificilă), nu ar avea sens să se expună un grup timp de 120 de minute, deoarece mortalitatea ar fi probabil de 100 %. Astfel, conducătorul studiului va selecta durate de expunere mai scurte pentru acea concentrație (de exemplu 90, 65, 45, 33 și 25 de minute).

▼M4

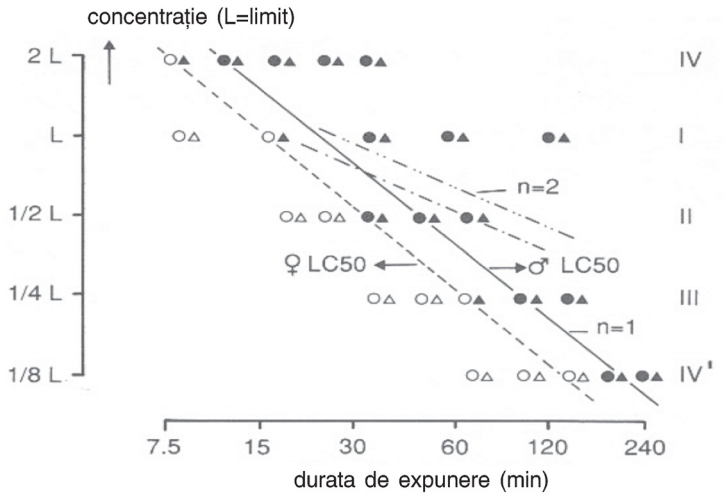
7. Concentrația incintei se măsoară frecvent, pentru a determina concentrația medie ponderată în timp pentru fiecare durată de expunere. De câte ori este posibil, în analiza statistică se folosește momentul morții fiecărui animal (în locul duratei de expunere).

8. Se examinează rezultatele primelor patru sesiuni de expunere pentru a identifica o neconcordanță de date în curba concentrație-timp (a se vedea figura 1). În cazul unei concordanțe insuficiente, se poate efectua o expunere suplimentară (a cincea concentrație). Concentrația și duratele de expunere pentru a cincea expunere sunt alese pentru a acoperi această neconcordanță.

9. Toate sesiunile de expunere (inclusiv prima sesiune de expunere) se vor folosi pentru a calcula relația concentrație-timp-răspuns pe baza analizei statistice (16). Atunci când este posibil, pentru fiecare interval C × t se folosește concentrația medie ponderată în timp și durata de expunere până la moarte (dacă moartea intervine în timpul expunerii).

Figura 1

Ilustrarea ipotetică a relației concentrație-timp-mortalitate la șobolani



Simboluri goale = supraviețuitori, simboluri pline = animale moarte

Triunghiuri = femele; cercuri = masculi

Linie plină = valori LC_{50} (domeniu 7,5-240 min) pentru masculi cu n = 1

Linie întreruptă = valori LC_{50} (domeniu 7,5-240 min) pentru femele cu n = 1

Linii punctate = valori ipotetice LC_{50} pentru masculi și femele dacă n ar fi fost egal cu 2 (12).

Glosar

concentrație:

durata de expunere:

▼M4

10. Mai jos se prezintă un exemplu de procedură secvențială:

Sesiunea de expunere I – Testare la concentrația-limită (a se vedea figura 1)

— 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total ([a])

— Concentrație-țintă ([b]) = concentrație-limită.

— Se expun cinci grupuri de animale la această concentrație-țintă pentru durate de 15, 30, 60, 120, respectiv 240 de minute.

↓

Sesiunea de expunere II ([c]) – Studiul principal

— 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.

— Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară ([d]) (1/2 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor √2; a se vedea figura 1).

↓

Sesiunea de expunere III – Studiul principal

— 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.

— Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară ([d]) (1/4 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor √2; a se vedea figura 1).

↓

Sesiunea de expunere IV' – Studiul principal

— 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.

— Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație inferioară ([d]) (1/8 L) cu durate de expunere puțin mai mari (eșalonat la un factor √2; a se vedea figura 1).

↓ sau

([a]) Dacă nu sunt disponibile informații privind receptivitatea în funcție de sex, se vor folosi șobolani de ambele sexe, adică 1 animal/sex per concentrație. Pe baza informațiilor existente sau dacă în cursul acestei sesiuni de expunere reiese că un sex este mai receptiv, se vor folosi 10 animale din sexul receptiv (2 animale per punct de concentrație/timp) la fiecare nivel de concentrație în timpul testării ulterioare.

([b]) În cazul în care se folosește Regulamentul (CE) nr. 1272/2008, concentrațiile-limită pentru gaze, vapori și aerosoli sunt de 20 000 ppm, 20 mg/l, respectiv 5 mg/l. În cazul toxicității anticipate sau pe baza rezultatelor studiului de observare, se aleg concentrații inițiale mai mici. În cazul necesităților de reglementare sau științifice, se pot folosi concentrații mai mari.

([c]) În mod ideal, expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există un nivel rezonabil de încredere că animalele testate anterior vor supraviețui. Aceasta permite conducătorului studiului să ajusteze concentrația țintă pentru următoarea sesiune de expunere.

([d]) Doza minimă (concentrație × timp) care a condus la mortalitate în timpul testării la concentrația inițială (prima sesiune de expunere) va fi considerată o indicație pentru a stabili următoarea combinație între concentrație și duratele de expunere. De obicei, concentrația va fi redusă la jumătate (1/2 L) iar animalele vor fi expuse pentru un nou interval de timp cu o grilă mai mică, folosind o diviziune geometrică a perioadelor de expunere cu un factor 1,4 (√2; a se vedea referința bibliografică 11) în jurul timpului în conformitate cu nivelul dozei letale minime (timp × concentrație) observat la prima expunere. În această figură (figura 1), mortalitatea la sesiunea de expunere I a fost observată inițial la 15 min.; prin urmare, duratele în timpul sesiunii II sunt centrate în jurul valorii de 30 min. și sunt 15, 21, 30, 42 și 60 min. După primele două expuneri, se recomandă să se reprezinte grafic datele într-o figură similară cu cea prezentată mai sus și să se verifice dacă relația între concentrație și timp are un unghi de 45 grade (n = 1) sau dacă relația concentrație-timp-răspuns este mai puțin abruptă (de exemplu n = 2) sau mai abruptă (de exemplu, n = 0,8). În al doilea caz, se recomandă să se adapteze corespunzător concentrațiile și duratele următoare.

▼M4

Sesiunea de expunere IV – Studiul principal

— 1 animal/sex per punct de concentrație/timp; 10 animale în total.

— Se expun cinci grupuri de animale la o concentrație superioară (e) (2 L) cu durate de expunere puțin mai mici (eșalonat la un factor √2; a se vedea figura 1).

Interpretarea matematică a rezultatelor pentru protocolul C × t

11. O procedură C × t cu 4 sau 5 concentrații de expunere și cinci durate va genera 20, respectiv 25 de puncte experimentale. Cu aceste puncte experimentale, relația C × t se poate calcula cu ajutorul analizei statistice (16):

Ecuația 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

unde C = concentrația; t = durata expunerii sau

Ecuația 2:

$$Response = f(C^n t)$$

unde $n = b_1/b_2$.

Cu ajutorul ecuației 1 se poate calcula valoarea LC_{50} pentru un interval de timp dat (de exemplu, 4 ore, 1 oră, 30 de minute sau orice interval de timp din domeniul intervalelor testate), folosind P = 5 (50 % răspuns). Trebuie reținut faptul că regula lui Haber se poate aplica doar în cazul în care n = 1. LC_{01} se poate calcula folosind P = 2,67.

(e) În anumite cazuri poate fi necesar să se crească concentrația (2 L) pentru un nou domeniu de timp cu o grilă și mai mică, folosind o diviziune geometrică a perioadelor de expunere cu un factor de 1,4 (√2) în jurul timpului, în conformitate cu nivelul dozei letale minime observat la prima expunere. Ar fi de preferat ca durata de expunere minimă să depășească 5 minute; iar durata maximă de expunere nu trebuie să depășească 8 ore.

▼B

B.3. **TOXICITATEA ACUTĂ (ADMINISTRARE CUTANATĂ)**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B (litera A).

1.2. DEFINIȚIE

A se vedea introducerea generală partea B (litera B).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se aplică pe piele, în doze crescătoare, la mai multe loturi, câte o doză pentru fiecare lot. Ulterior se fac observații cu privire la efectele toxice și mortalitate. Animalele care mor pe perioada testării sunt autopsiate, iar la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare se supun și ele autopsiei.

Animalele care prezintă semne grave de suferință sunt eutanasiate. Se evită administrarea substanțelor cu proprietăți corosive sau iritante în moduri care pot produce suferințe grave.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează la întâmplare în loturile tratate. Cu aproximativ 24 ore înaintea testului, blana din zona dorsală a trunchiului animalelor se tunde sau se rade cu atenție pentru a nu produce escoriații care ar putea altera permeabilitatea pielii. Pentru aplicarea substanței de testat este pregătită cel puțin 10 % din suprafața corpului. Dacă se testează substanțe solide, acestea se umezesc suficient cu apă sau, dacă este necesar, cu un vehicul corespunzător care să asigure un contact bun cu pielea. Dacă se folosește un vehicul, trebuie luată în considerare influența acestuia asupra penetrabilității cutanate. Substanțele lichide testate se folosesc, în general, nediluate.

1.6.2. **Condiții de testare**

1.6.2.1. *Animale de experiență*

Se folosesc șobolani sau iepuri adulți. Se pot folosi și alte specii, dar folosirea acestora trebuie justificată. Se folosesc animale din liniile obișnuite de laborator. Pentru fiecare sex, la începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie.

▼B

1.6.2.2. *Număr și sex*

Pentru fiecare doză se folosesc cel puțin 5 animale, de același sex. Dacă se folosesc femele, acestea trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă există informații demonstrate că unul din sexe prezintă o sensibilitate mai mare, vor fi supuse testului animale de sexul respectiv.

Notă: În testele de toxicitate acută efectuate pe animale aparținând unui ordin mai înalt decât rozătoarele se folosesc mai puține animale. Dozele se aleg astfel încât să nu se depășească dozele moderat toxice. În astfel de teste se evită administrarea dozelor letale de substanță de testat.

1.6.2.3. *Doze*

Dozele trebuie alese în număr suficient (cel puțin trei) și astfel încât să producă o gamă de efecte toxice și mortalitate. La alegerea dozelor trebuie luate în considerare eventualele efecte iritante sau corosive. Informațiile trebuie să permită înregistrarea unei curbe doză/răspuns și, unde este posibil, determinarea DL_{50}.

1.6.2.4. *Testul-limită*

Pe un lot de 5 masculi și 5 femele se poate efectua un test-limită cu doză unică de cel puțin 2 000 mg/kg masă corporală, folosind tehnica descrisă mai sus. Dacă apare mortalitate corelată cu doza, se efectuează un studiu complet.

1.6.2.5. *Perioada de observație*

Perioada de observație este de minimum 14 zile. Cu toate acestea, durata observațiilor nu este fixată în mod rigid, ci se stabilește în funcție de efectele toxice, intensitatea lor la debut și perioada de recuperare. Perioada de observație poate fi extinsă, dacă se consideră necesar. Momentul în care apar și dispar semnele de toxicitate și momentul morții sunt factori importanți, mai ales dacă mortalitatea tinde să fie una tardivă.

1.6.3. **Mod de operare**

Fiecare animal este ținut într-o cușcă individuală. Substanța de testat se aplică uniform pe o porțiune de aproximativ 10 % din suprafața corporală totală. Zona de aplicare poate fi mai redusă în cazul substanțelor foarte toxice, dar se acoperă o suprafață cât mai mare, cu un strat cât se poate de subțire și de uniform.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui bandaj de tifon și al unui plasture neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină bandajul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acesteia de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă.

▼B

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

În timpul expunerii și după aceasta au loc observații care sunt înregistrate sistematic; pentru fiecare animal se consemnează date individuale. Se fac observații frecvente în prima zi. Cel puțin o dată pe zi lucrătoare, se procedează la o examinare clinică atentă; se fac și alte observații zilnice și se iau măsurile necesare pentru a reduce la minim pierderea animalelor din studiu, cum ar fi autopsia sau congelarea exemplarelor găsite moarte și izolarea sau sacrificarea celor slăbite sau muribunde.

Observațiile vizează modificări ale blănii, pielii tratate, ochilor, mucoaselor, sistemului respirator, circulator, sistemului nervos central și sistemului nervos autonom, ale activității somato-motrice și comportamentului. Trebuie acordată o atenție deosebită următoarelor aspecte: tremor, convulsii, salivație, diaree, letargie, somn și comă. Momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil. Animalele care mor pe parcursul testului și cele care supraviețuiesc la terminarea lui se supun autopsiei. Toate modificările anatomopatologice macroscopice sunt înregistrate. Dacă este astfel indicat, se recoltează țesuturi pentru examenul histopatologic.

Evaluarea toxicității la sexul opus

După terminarea studiului pentru unul din sexe, substanța de testat se administrează la cel puțin un lot de 5 animale de sex opus, pentru a stabili dacă animalele care aparțin acestui sex prezintă o sensibilitate mai pronunțată la substanța de testat. În circumstanțe individuale poate fi justificată folosirea unui număr mic de animale. Dacă sunt disponibile informații care demonstrează că animalele aparținând sexului tratat prezintă o sensibilitate mai mare, nu mai este necesară testarea pe animale de sex opus.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele. Pentru fiecare lot testat se consemnează: numărul animalelor la începutul testului; momentul morții pentru fiecare animal; numărul de animale care manifestă alte semne de toxicitate; descrierea efectelor toxice; rezultatele autopsiei. Greutatea animalelor este determinată și înregistrată cu puțin timp înaintea aplicării substanței de testat, apoi săptămânal până în momentul decesului; modificările în greutate se calculează și se înregistrează, dacă supraviețuirea depășește o zi. Animalele sacrificate datorită suferinței intense provocate de compusul folosit se înregistrează ca decese datorate efectelor substanței de testat. DL_{50} se determină printr-o metodă recunoscută.

Rezultatele evaluării cuprind, dacă este posibil, o apreciere a relației între expunerea animalului la substanța de testat și incidența și severitatea tuturor modificărilor apărute, inclusiv: modificări comportamentale și clinice, leziuni macroscopice, variații ale greutății corporale, mortalitate, alte efecte toxice.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

▼B

— specia, linia, sursa, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile de testare (inclusiv metoda de curățare a pielii și tipul de bandaj: ocluziv sau neocluziv);

— dozele (cu indicarea vehiculului, dacă se folosește, și concentrațiile);

— sexul animalelor tratate;

— tabele cu rezultatele răspunsului, structurate după sex și doză (numărul animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe parcursul testului, numărul animalelor care prezintă semne de toxicitate, numărul animalelor expuse);

— momentul morții după tratament, argumente și criterii folosite pentru eutanasierea animalelor;

— toate observațiile;

— valoarea DL_{50} (cu specificarea metodei de determinare) pentru sexul care a reprezentat obiectul unui studiu complet pe o perioadă de 14 zile;

— intervalul de încredere 95 % pentru DL_{50} (când poate fi prezentat);

— curba doză/mortalitate și panta dreptei de regresie, acolo unde permite metoda de determinare;

— rezultatele autopsiei;

— rezultatele histopatologice;

— rezultatele testelor pe sexul opus;

— discutarea rezultatelor (o atenție particulară se acordă efectului pe care numărul animalelor sacrificate pe parcursul testului l-ar putea avea asupra valorii calculate a DL_{50});

— interpretarea rezultatelor.

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B (litera D).

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera E).

▼M8

B.4. IRITAȚIE/COROZIUNE CUTANATĂ ACUTĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 404 (2015). Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic pentru a se asigura că acestea reflectă cele mai bune cunoștințe științifice disponibile. La revizuirea orientării 404 a OCDE privind testarea, s-a acordat o atenție deosebită posibilelor îmbunătățiri în ceea ce privește problemele de bunăstare animală și evaluării tuturor informațiilor existente privind substanța chimică de testat pentru a se evita testarea inutilă pe animale de laborator. Versiunea actualizată a Orientării nr. 404 a OCDE privind testarea (adoptată inițial în 1981, revizuită în 1992, 2002 și 2015) include o trimitere la documentul de orientare privind strategiile integrate pentru testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru iritație/coroziune cutanată (1), propunând o abordare modulară pentru testarea iritației și a coroziunii cutanate. IATA descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și (i) oferă îndrumări cu privire la modul de integrare și utilizare a datelor existente provenite din teste și care nu provin din teste pentru evaluarea potențialului de iritație cutanată și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (1). În plus, dacă este necesar, se recomandă în respectiva orientare să se opteze pentru aplicarea succesivă, și nu simultană, a celor trei plasturi la animalul de experiență în cadrul testului inițial *in vivo*.

2. Definiții pentru iritația și coroziunea cutanată sunt prezentate în apendicele la prezenta metodă de testare.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

3. În interesul acurateței științifice și al bunăstării animale, testele *in vivo* nu ar trebui să fie efectuate până când nu au fost evaluate toate datele disponibile relevante pentru o posibilă corosivitate/iritație cutanată a substanței chimice de testat în cadrul unei analize a valorii probante a datelor (WoE), astfel cum este prezentată în Documentul de orientare privind abordările integrate de testare și evaluare în ceea ce privește coroziunea și iritația cutanată, și anume, în cele trei părți ale prezentei orientări și în modulele aferente (1). Pe scurt, în partea 1, sunt abordate datele existente pe parcursul a șapte module care acoperă date umane, date *in vivo*, date *in vitro*, date privind proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH-ul, în special o aciditate sau alcalinitate puternică) și metode care nu implică testarea. În partea 2, este efectuată analiza bazată pe forța probantă a datelor (FPD). Dacă această analiză FPD este încă neconcludentă, partea 3 ar trebui să fie desfășurată cu efectuarea de teste suplimentare, începând cu metodele *in vitro*, iar testarea *in vivo* este utilizată ca soluție de ultimă instanță. Această analiză ar trebui așadar să reducă necesitatea efectuării unor teste *in vivo* de coroziune/iritație cutanată asupra substanțelor chimice de testat pentru care există deja dovezi suficiente din alte studii privind aceste două puncte finale.

PRINCIPIUL TESTULUI IN VIVO

4. Substanța chimică de testat se aplică într-o singură doză pe pielea unui animal de experiență; zonele netratate ale pielii animalului de experiență se utilizează ca martor. La intervale specificate se examinează și se punctează gradul de iritare/coroziune, care este descris în detaliu pentru a permite o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru evaluarea reversibilității sau ireversibilității efectelor observate.

▼M8

5. Animalele care manifestă semne persistente de suferință și/sau dureri profunde în orice etapă a testului sunt eutanasiate, iar substanța chimică de testat se evaluează în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau suferinde fac obiectul unui document de orientare separat (2).

PREGĂTIREA PENTRU TESTUL IN VIVO

Selecția speciilor de animale

6. Se preferă utilizarea de exemplare adulte tinere și sănătoase de iepure albinos ca animale de laborator. Utilizarea altor specii ar trebui să fie justificată.

Pregătirea animalelor

7. Cu aproximativ 24 de ore înainte de test, se rade blana din regiunea dorsală de pe corpul animalelor. Se evită cu atenție jupuirea pielii și se utilizează exclusiv animalele cu pielea sănătoasă, intactă.

8. La unele suşe de iepuri, blana este mai deasă în unele zone, în anumite perioade ale anului. Astfel de zone în care crește o blană mai deasă nu ar trebui să fie utilizate ca zone de testare.

Condiții de adăpostire și hrănire

9. Animalele ar trebui să fie adăpostite individual. Temperatura incintei în care se află animalele de experiență ar trebui să fie de 20 °C (± 3 °C) pentru iepuri. Cu toate că umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 50-60 %. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă

PROCEDURA DE TESTARE

Aplicarea substanței chimice de testat

10. Substanța chimică de testat ar trebui să fie aplicată uniform pe o suprafață mică (aproximativ 6 cm^2) de piele și este menținută în contact cu pielea cu ajutorul unui bandaj de tifon și al unui plasture neiritant. În cazurile în care nu este posibilă aplicarea directă (de exemplu, lichide sau anumite paste), substanța chimică de testat ar trebui să fie aplicată mai întâi pe un bandaj de tifon, care este apoi aplicat pe piele. Se asigură un contact ușor între bandaj și piele cu ajutorul unui pansament semi-ocluziv pentru întreaga durată a perioadei de expunere. Dacă substanța chimică de testat este aplicată pe bandaj, aceasta se fixează pe piele astfel încât să existe un contact adecvat și o distribuție uniformă a substanței chimice de testat pe piele. Ar trebui să se împiedice accesul animalului la bandaj și ingerarea sau inhalarea substanței chimice de testat.

11. Substanțele chimice de testat lichide sunt utilizate, în general, în stare nediluată. La testarea substanțelor solide (care pot fi pulverizate, dacă se consideră necesar), substanța chimică de testat ar trebui să fie umezită cu cea mai redusă cantitate de apă (sau, dacă este necesar, cu un alt vehicul adecvat) suficient pentru a asigura un contact bun cu pielea. Atunci când se utilizează alte vehicule decât apa, o posibilă influență a vehiculului asupra iritației pielii provocate de substanța chimică de testat ar trebui să fie minimă, dacă există.

12. La sfârșitul perioadei de expunere, care este în mod normal de patru ore, substanța chimică de testat reziduală ar trebui să fie eliminată, atunci când este posibil, folosind apă sau un solvent adecvat fără a modifica răspunsul existent sau integritatea epidermei.

▼M8

Nivelul dozei

13. Pe zona de testare se aplică o doză de 0,5 ml de lichid sau de 0,5 g de substanță solidă sau pastă.

Testul inițial (test *in vivo* de iritație/coroziune cutanată utilizând un animal)

14. Atunci când o substanță chimică de testat este considerată a fi corozivă, iritantă sau neclasificată pe baza unor analize ale forței probante a datelor sau a unor teste *in vitro* anterioare, în mod normal nu este necesară efectuarea de teste *in vivo* suplimentare. Însă, în cazurile în care se justifică obținerea unor date suplimentare, testul *in vivo* este efectuat inițial utilizând un animal și aplicând abordarea de mai jos. Se aplică animalului, secvențial, maximum trei plasturi pentru testare. Primul plasture se îndepărtează după trei minute. Dacă nu se observă o reacție cutanată gravă, se aplică un al doilea plasture într-o altă zonă, care este îndepărtat după o oră. Dacă în această etapă, observațiile arată că poate fi permisă prelungirea expunerii la patru ore, fără a cauza suferințe, se aplică un al treilea plasture, care se îndepărtează după patru ore și se punctează reacția.

15. Dacă se observă un efect coroziv după oricare dintre cele trei expuneri secvențiale, testul se încheie imediat. Dacă nu se observă un efect coroziv după îndepărtarea ultimului plasture, animalul se observă timp de 14 zile, cu excepția cazului în care coroziunea se manifestă mai devreme.

16. În cazurile în care se estimează că substanța chimică de testat nu este corozivă, dar ar putea fi iritantă, se aplică un singur plasture unui animal, timp de patru ore.

Test de confirmare (test de iritație cutanată *in vivo* pe animale suplimentare)

17. Dacă la testul inițial nu se observă efecte corozive, reacția de iritație sau negativă se confirmă prin testarea a maximum alte două animale, fiecare cu câte un plasture, cu o perioadă de expunere de patru ore. Dacă se observă un efect iritant la testul inițial, testul de confirmare poate fi efectuat secvențial sau prin expunerea simultană a celor două animale suplimentare. În cazul excepțional în care nu se efectuează testul inițial, două sau trei animale pot fi tratate cu câte un singur plasture, care se îndepărtează după patru ore. Dacă se utilizează două animale și ambele manifestă aceeași reacție, nu mai sunt necesare teste suplimentare. În caz contrar, se testează și al treilea animal. Este posibil să fie necesară evaluarea reacțiilor echivoce utilizând alte animale.

Perioada de observație

18. Durata perioadei de observare ar trebui să fie suficientă pentru evaluarea completă a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul ar trebui să fie încheiat dacă animalul prezintă semne persistente de durere sau suferință profundă. Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele ar trebui să fie observate timp de până la 14 zile de la îndepărtarea plasturilor. Dacă reversibilitatea intervine înainte de 14 zile, experimentul ar trebui încheiat în acel moment.

Observații clinice și punctarea reacțiilor cutanate

19. Ar trebui să se examineze semnele de eritem și edem la toate animalele și să se puncteze reacțiile la 60 de minute, iar apoi la 24, 48 și 72 de ore de la îndepărtarea plasturilor. Pentru testul inițial pe un singur animal, zona de testare se examinează, de asemenea, imediat după îndepărtarea plasturelui. Reacțiile cutanate se punctează și se înregistrează conform punctajelor din tabelul de mai jos. Dacă la 72 de ore se observă leziuni cutanate care nu pot fi identificate ca iritații sau coroziuni, este posibil să fie necesară observarea timp de 14 zile, pentru a determina reversibilitatea efectelor. În plus față de examinarea iritației, se descriu și se înregistrează toate efectele toxice locale,

▼M8

precum uscarea pielii, și orice efecte sistemice adverse (de exemplu, efecte manifestate prin semne clinice de toxicitate sau efecte asupra greutății corporale). Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se efectuează un examen histopatologic.

20. Punctarea reacțiilor cutanate este neapărat subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor cutanate și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și a persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de punctaj utilizat (a se vedea tabelul de mai jos). Ar putea fi util un ghid ilustrat pentru punctarea iritațiilor dermice și a altor leziuni (3).

DATE ȘI RAPORTARE

21. Rezultatele studiului ar trebui să fie sintetizate în formă tabelară în raportul final al testului și să includă toate punctele menționate la punctul 24.

Evaluarea rezultatelor

22. Punctajele privind iritația cutanată ar trebui să fie evaluate în legătură cu natura și severitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea lor. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale unui material de testat, întrucât se evaluează și alte efecte ale materialului. În schimb, punctajele individuale ar trebui să fie considerate drept valori de referință, care trebuie să fie evaluate în legătură cu toate celelalte observații ale studiului.

23. Reversibilitatea leziunilor cutanate ar trebui să fie luată în considerare la evaluarea reacțiilor iritante. Atunci când reacții precum alopecia (zonă limitată), hiperkeratoza, hiperplazia și exfolierea persistă la sfârșitul perioadei de observare de 14 zile, substanța chimică de testat ar trebui să fie considerată drept iritantă.

Raportul testului

24. Raportul testului trebuie să includă următoarele informații:

Justificarea pentru testarea in vivo:

— analiza valorii probante a datelor prealabile testului, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale;

— descrierea datelor relevante disponibile din testele anterioare;

— date obținute în fiecare etapă a strategiei de testare;

— descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detalii privind procedurile, rezultatele obținute cu substanțele de testat/de referință;

— analiza valorii probante a datelor pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța chimică de testat:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

▼**M8**

— Substanță multicomponentă, amestec și substanțe cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice (UVCB): în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Vehicul:

— identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;

— justificarea alegerii vehiculului.

Animal(e) de testare:

— specie/șușă utilizată, justificarea utilizării altui (altor) animal(e) decât iepurele albinos;

— numărul de animale din fiecare sex;

— greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului;

— vârsta la începutul studiului;

— sursa animalului (animalelor), condiții de adăpostire, regimul alimentar etc.

Condiții de testare:

— tehnica de pregătire a zonei de aplicare a plasturelui;

— detalii despre materialele folosite pentru plasture și despre tehnica aplicării plasturelui;

— detalii privind prepararea, aplicarea și îndepărtarea substanței chimice de testat.

Rezultate:

— tabel cu punctajele acordate pentru reacția de iritație/coroziune, pentru fiecare animal, în fiecare moment măsurat;

— descrierea tuturor leziunilor observate;

— descrierea narativă a naturii și gradului de iritație/coroziune observat și concluziile examenului histopatologic;

— descrierea altor efecte locale adverse (de exemplu, uscarea pielii) și a altor efecte sistemice apărute în plus față de iritația sau coroziunea cutanată.

▼**M8**

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, astfel cum a fost aprobat în cadrul celei de a 28-a reuniuni comune a Comitetului privind substanțele chimice (Chemicals Committee) și a Grupului de lucru privind substanțele chimice (Working Party on Chemicals), noiembrie 1998.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

Tabel

Punctarea Reacțiilor Cutanate

Formarea de eriteme și escare

Fără eritem	0
Eritem foarte redus (greu perceptibil)	1
Eritem bine definit	2
Eritem moderat spre sever	3
Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului	4

Maximum posibil: 4

Formarea de edeme

Fără edem	0
Edem foarte redus (greu perceptibil)	1
Edem redus (contururile zonei sunt bine definite prin proeminență clară)	2
Edem moderat (proeminență de aproximativ 1 mm)	3
Edem sever (proeminență mai mare de 1 mm și extindere dincolo de zona de expunere)	4

Maximum posibil: 4

Pentru clarificarea reacțiilor echivoce se poate proceda la un examen histopatologic.

▼**M8**

Apendice

DEFINIȚII

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Iritație cutanată înseamnă producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la 4 ore.

Coroziune cutanată înseamnă producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile corozive sunt tipic exemplificate de ulcere, sângerare, cruste de sânge și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, prin decolorare datorată depigmentării pielii, zone complete de alopecie, precum și cicatrici. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare.

▼M7

B.5. COROZIUNE/IRITAȚIE OCULARĂ ACUTĂ

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 405 (2012). Orientările OCDE privind testarea pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic pentru a se asigura că acestea reflectă cele mai bune cunoștințe științifice disponibile. În revizuirile anterioare ale respectivei orientări privind testarea s-a acordat o atenție deosebită posibilelor îmbunătățiri prin evaluarea tuturor informațiilor existente cu privire la substanța chimică de testat pentru a se evita testarea inutilă pe animale de laborator și, prin urmare, pentru a aborda preocupările privind bunăstarea animală. TG 405 (adoptată în 1981 și actualizată în 1987, 2002 și 2012) include recomandarea ca, înainte de efectuarea testării *in vivo* descrise pentru coroziune/iritație oculară acută, să fie efectuată o analiză a valorii probante (1) a datelor existente relevante. În cazul în care datele disponibile sunt insuficiente, se recomandă ca acestea să fie dezvoltate prin aplicarea testării secvențiale (2) (3). Strategia de testare include efectuarea unor teste *in vitro* validate și acceptate și este prezentată ca o completare la această metodă de testare. În sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) ([1]), o strategie de testare integrată este inclusă, de asemenea, în Orientarea ECHA relevantă (21). Testarea pe animale se efectuează doar în cazul în care se determină necesitatea acesteia, după ce se iau în considerare metodele alternative disponibile și prin utilizarea celor determinate a fi adecvate. La momentul redactării acestei metode de testare actualizate, există cazuri în care utilizarea acestei metode de testare este încă necesară sau impusă în temeiul unor cadre de reglementare.

Ultima actualizare s-a axat în principal pe utilizarea de analgezice și anestezice, fără a avea impact asupra conceptului de bază și asupra structurii orientării privind testarea. ICCVAM ([2]) și un grup științific independent și internațional de revizuire inter pares au analizat utilitatea și limitele utilizării în mod obișnuit de anestezice topice, analgezice sistemice și puncte finale umane în timpul testării de siguranță *in vivo* pentru iritația oculară (12). În urma evaluării, s-a constatat că utilizarea de anestezice topice și analgezice sistemice ar putea evita integral sau în mare parte durerea și suferința fără a afecta rezultatul testului și s-a recomandat utilizarea întotdeauna a acestor substanțe. Această metodă de testare ia în considerare revizuirea respectivă. Anestezicele topice, analgezicele sistemice și punctele finale umane sunt utilizate în mod obișnuit în timpul testării *in vivo* a iritației și coroziunii oculare acute. Excepțiile de la utilizarea acestora trebuie justificate. Îmbunătățirile descrise în prezenta metodă vor reduce în mod substanțial sau vor evita durerea și suferința animalelor în cele mai multe situații de testare în care testarea *in vivo* pentru siguranță oculară este încă necesară.

Gestionarea echilibrată și preemptivă a durerii trebuie să includă (i) un pretratament de rutină cu anestezic topic (de exemplu, proparacaină sau tetracaină) și un analgezic sistemic (de exemplu, buprenorfină), (ii) schema post-tratament de rutină a analgezicelor sistemice (de exemplu, buprenorfină și meloxicam), (iii) observarea, monitorizarea și înregistrarea planificată a animalelor pentru identificarea semnelor clinice de durere și/sau suferință și (iv) observarea, monitorizarea și înregistrarea planificată a naturii, gravității și evoluției tuturor leziunilor oculare. Mai multe detalii sunt furnizate în versiunea actualizată a procedurilor

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei. JO L 304, 22.11.2007, p. 1.

([2]) Comitetul SUA de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative.

▼M7

descrisă mai jos. După administrarea substanței chimice de testat nu se administrează anestezice topice sau analgezice suplimentare, în vederea evitării interferențelor cu studiul. Analgezicele cu acțiune antiinflamatorie (de exemplu, meloxicam) nu se aplică topic, iar dozele utilizate sistemic nu trebuie să interfereze cu efectele oculare.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele la metoda de testare.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

În interesul acurateței științifice și al bunăstării animalelor, testele *in vivo* nu trebuie luate în considerare până când toate datele relevante disponibile pentru potențialul de coroziune/iritație oculară al substanței chimice nu au fost evaluate într-o analiză a valorii probante a datelor. Astfel de date includ dovezi din studiile deja efectuate asupra oamenilor și/sau asupra animalelor de laborator, dovezi privind caracterul coroziv/iritant al uneia sau mai multor substanțe chimice înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe, date demonstrând o puternică aciditate sau alcalinitate a substanței chimice (4) (5) și rezultatele validate și acceptate ale unor teste *in vitro* sau *ex vivo* de coroziune cutanată și de coroziune/iritație oculară (6) (13) (14) (15) (16) (17). Este posibil ca astfel de studii să fi fost efectuate înaintea sau ca urmare a unei analize a valorii probante a datelor.

Pentru anumite substanțe chimice, o astfel de analiză poate indica necesitatea efectuării unor studii *in vivo* privind potențialul de coroziune/iritație oculară al substanței chimice. În toate aceste cazuri, înainte de a lua în considerare efectuarea testului ocular *in vivo*, este de preferat să se efectueze mai întâi un studiu *in vitro* și/sau *in vivo* asupra efectelor de coroziune cutanată ale substanței chimice, studiu care ar trebui să fie evaluat în conformitate cu strategia de testare secvențială din metoda de testare B.4 (7) sau strategia de testare integrată descrisă în Orientarea ECHA (21).

O strategie de testare secvențială, care include efectuarea de teste validate *in vitro* sau *ex vivo* pentru coroziune/iritație oculară, este inclusă drept Supliment la această metodă de testare și, în scopul REACH, în Orientarea ECHA (21). Se recomandă aplicarea acestei strategii de testare înainte de efectuarea testului *in vivo*. Pentru substanțele chimice noi, se recomandă o abordare de testare graduală pentru obținerea unor date științifice exacte privind caracterul coroziv/iritant al substanței chimice. În cazul substanțelor chimice existente pentru care nu există date suficiente privind coroziunea/iritația cutanată și oculară, strategia poate fi utilizată pentru completarea datelor lipsă. Utilizarea unei strategii sau proceduri diferite de testare sau decizia de a nu utiliza o abordare de testare graduală trebuie justificate.

PRINCIPIUL TESTULUI *IN VIVO*

În urma unui pretratament cu un analgezic sistemic și după inducția adecvată a anesteziei topice, substanța chimică de testat se aplică, într-o singură doză, pe un ochi al animalului de laborator; celălalt ochi este utilizat drept martor. Nivelul de iritație/coroziune oculară se evaluează prin examinarea leziunilor care afectează conjunctiva, corneea și irisul, la intervale prestabilite. Se descriu, de asemenea, celelalte efecte asupra ochiului sau efecte sistemice adverse, pentru a asigura o evaluare completă a efectelor. Durata studiului trebuie să fie suficientă pentru a evalua reversibilitatea sau ireversibilitatea efectelor.

Animalele care manifestă semne de suferință și/sau dureri profunde în orice etapă a testului sau leziuni de tipul celor întâlnite în punctele finale umane descrise în această metodă de testare (a se vedea punctul 26) sunt eutanasiate, iar substanța chimică este evaluată în consecință. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere în condiții umane a animalelor muribunde sau suferinde fac obiectul unui document de orientare al OCDE (8).

▼M7

PREGĂTIREA PENTRU TESTUL *IN VIVO*

Selectarea speciilor

Se utilizează, de preferat, exemplare adulte, tinere, sănătoase de iepure albinos. Utilizarea altor șușe sau specii trebuie justificată.

Pregătirea animalelor

Cu 24 de ore înainte de începerea testului, se examinează ambii ochi ai animalului de experiență selectat provizoriu. Nu se utilizează exemplarele care prezintă iritații sau defecte oculare sau leziuni corneene preexistente.

Condiții de adăpostire și de hrănire

Animalele se adăpostesc individual. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 20 °C (± 3 °C) pentru iepuri. Cu toate că umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 50-60 %. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Se evită intensitatea excesivă a luminii. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

PROCEDURA DE TESTARE

Utilizarea de anestezice topice și analgezice sistemice

Următoarele proceduri sunt recomandate pentru a se evita sau reduce la minimum durerea și suferința în procedurile de testare pentru siguranță oculară. Procedurile alternative, care au fost determinate ca oferind aceeași sau o mai bună evitare sau combatere a durerii și suferinței, pot fi substituite.

— Cu șaizeci de minute înainte de aplicarea substanței chimice de testat (TCA), se administrează 0,01 mg/kg buprenorfină prin injectare subcutanată (s.c.) pentru a asigura un nivel terapeutic de analgezie sistemică. Buprenorfina și altele analgezice opiode similare, administrate sistemic, nu sunt cunoscute sau nu se preconizează să modifice reacțiile oculare (12).

— Cu cinci minute înainte de TCA, se aplică în fiecare ochi una sau două picături de anestezic topic ocular (de exemplu, clohidrat de proparacaină 0,5 % sau cloridrat de tetracaină 0,5 %). Pentru a evita posibila interferență cu studiul, se recomandă utilizarea unui anestezic topic care nu conține conservanți. Ochiul fiecărui animal care nu este tratat cu o substanță chimică de testat, dar care este tratat cu anestezia topică, este utilizat ca martor. În cazul în care se anticipează că substanța chimică testată va provoca dureri sau suferințe semnificative, aceasta nu se testează, în mod normal, *in vivo*. Cu toate acestea, în cazul în care există îndoieli sau atunci când este necesar, se ia în considerare utilizarea unor administrări suplimentare de anestezic topic la intervale de 5 minute înainte de TCA. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că administrările multiple de anestezice topice pot cauza o creștere ușoară a gradului de severitate și/sau a timpului necesar pentru ca leziunile induse de substanța chimică să se vindece.

— Opt ore după TCA, sunt administrate 0,01 mg/kg buprenorfină s.c. și 0,5 mg/kg meloxicam s.c. pentru a asigura un nivel terapeutic continuu de analgezice sistemice. În pofida faptului că nu există date care să sugereze că meloxicamul are efecte antiinflamatorii asupra ochilor atunci când este administrat s.c. o dată pe zi, meloxicamul nu trebuie administrat până la cel puțin 8 ore după TCA pentru a evita orice posibilă interferență cu studiul (12).

— După tratamentul post-TCA din primele 8 de ore, se administrează 0,01 mg/kg buprenorfină s.c. la intervale de 12 ore, asociat cu 0,5 mg/kg meloxicam s.c. la fiecare 24 de ore, până la vindecarea leziunilor oculare și la dispariția

▼M7

oricărui semn clinic de durere și de stres. Sunt disponibile preparate analgezice cu eliberare susținută care pot fi luate în considerare pentru a reduce frecvența de dozare cu analgezice.

— Analgezice de „salvare” se administrează imediat după TCA în cazul în care analgezia preemptivă și anestezia topică sunt insuficiente. În cazul în care un animal prezintă semne de durere și suferință pe parcursul studiului, o doză „salvatoare” de 0,03 mg/kg buprenorfină s.c. se administrează imediat și se repetă la fiecare 8 ore, dacă se consideră necesar, în loc de 0,01 mg/kg s.c. la fiecare 12 ore. La fiecare 24 de ore se administrează meloxicam 0,5 mg/kg s.c., asociat cu doza „salvatoare” de buprenorfină, dar nu mai repede de cel puțin 8 ore post TCA.

Aplicarea substanței chimice de testat

Substanța chimică de testat se aplică în sacul conjunctival al unui ochi al fiecărui animal, după îndepărtarea delicată a pleoapei inferioare de pe globul ocular. Pleoapele se țin apoi lipite pentru circa o secundă, pentru a preveni pierderea materialului. Celălalt ochi, care nu se tratează, se utilizează ca martor.

Irigația

Ochii animalelor testate nu se spală timp de cel puțin 24 de ore de la instilația substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care substanța este solidă (a se vedea punctul 18) și a cazului în care apar efecte corozive sau iritante imediate. După 24 de ore, se procedează la o spălare, dacă se consideră necesar.

Nu se recomandă utilizarea unui grup satelit de animale pentru a analiza influența spălării, cu excepția cazului în care acest lucru se justifică științific. În cazul în care este necesar un grup satelit, se folosesc doi iepuri. Se descriu detaliat condițiile de spălare, de exemplu momentul spălării; compoziția și temperatura soluției utilizate; durata, volumul și viteza de aplicare.

Nivelul dozei

(1) *Testarea lichidelor*

Pentru testarea lichidelor se utilizează o doză de 0,1 ml. Nu se utilizează pulverizatoare cu pompă pentru instilarea substanței chimice direct în ochi. Se recomandă extragerea lichidului și colectarea acestuia într-un container înainte de instilarea a 0,1 ml în ochi.

(2) *Testarea solidelor*

La testarea solidelor, a pastelor și a substanțelor sub formă de particule, cantitatea utilizată are un volum de 0,1 ml sau o greutate de cel mult 100 mg. Substanța chimică de testat se macină într-un praf fin. Volumul materialului solid se măsoară după o compactare delicată, de exemplu, bătând ușor cu palma recipientul de măsură. În cazul în care substanța chimică solidă de testat nu a fost îndepărtată din ochiul animalului de experiență prin mecanisme fiziologice în primul moment prestabilit de observare, și anume la o oră după tratament, ochiul poate fi spălat cu o soluție salină sau cu apă distilată.

(3) *Testarea aerosolilor*

Se recomandă colectarea conținutului tuturor pulverizatoarelor cu pompă și aerosolilor înainte de instilarea în ochi. Singura excepție o constituie substanțele chimice în containere sub presiune pentru aerosoli, care nu pot fi colectate din cauza vaporizării. În acest caz, ochiul se ține deschis, iar substanța chimică de testat se administrează în ochi cu un singur jet de circa o secundă, de la o distanță de 10 cm perpendicular pe ochi. Distanța poate varia în funcție de presiunea pulverizatorului și conținutul acestuia. Se evită lezarea ochiului din cauza presiunii pulverizatorului. În unele cazuri, se poate dovedi necesar să se evalueze posibilitatea provocării unor leziuni „mecanice” ochiului prin forța pulverizatorului.

▼M7

O estimare a dozei dintr-un aerosol poate fi efectuată simulând testul astfel: substanță chimică se pulverizează pe o bucată de hârtie de cântărit, printr-o deschidere de dimensiunea ochiului unui iepure amplasată direct în fața hârtiei. Cantitatea pulverizată în ochi se estimează pe baza creșterii greutății hârtiei. Pentru substanțele chimice volatile, doza poate fi estimată prin cântărirea unui recipient în care este pulverizată substanța, înainte și după îndepărtarea substanței chimice de testat.

Testul inițial (test in vivo de iritație/coroziune oculară pe un animal)

Se recomandă ca testul *in vivo* să se efectueze inițial pe un singur animal (a se vedea Suplimentul la prezenta metodă de testare: O strategie de testare secvențială pentru iritația și coroziunea oculară). Observațiile trebuie să permită determinarea gravității și a reversibilității înainte de a se trece la un test de confirmare pe un al doilea animal.

În cazul în care rezultatele acestui test indică faptul că substanța chimică este corozivă sau foarte iritantă la nivel ocular utilizându-se procedura descrisă, nu se efectuează teste suplimentare de iritație oculară.

Testul de confirmare (test in vivo de iritație oculară pe animale suplimentare)

În cazul în care nu se observă un efect coroziv sau sever iritant la testul inițial, reacția iritantă sau negativă se confirmă utilizând maximum alte două animale. În cazul în care se observă un efect iritant la testul inițial, se recomandă efectuarea testului de confirmare în mod secvențial, pe câte un animal, și nu prin expunerea simultană a celor două animale suplimentare. În cazul în care la al doilea animal apar efecte corozive sau puternic iritante, testul se întrerupe. În cazul în care rezultatele celui de-al doilea animal sunt suficiente pentru a permite determinarea clasificării pericolelor, nu se efectuează teste suplimentare.

Perioada de observație

Durata perioadei de observație trebuie să fie suficientă pentru evaluarea completă a amplorii și a reversibilității efectelor observate. Cu toate acestea, experimentul se încheie dacă animalul manifestă semne de suferință sau dureri profunde (8). Pentru a determina reversibilitatea efectelor, animalele se observă timp de 21 de zile după administrarea substanței chimice de testat. În cazul în care reversibilitatea intervine înainte de expirarea celor 21 de zile, experimentul se încheie în momentul respectiv.

Observații clinice și punctarea reacțiilor oculare

Ochii se supun unei evaluări cuprinzătoare pentru a stabili prezența sau absența leziunilor oculare la o oră după TCA, urmată de evaluări cel puțin zilnic. Animalele se evaluează de mai multe ori pe zi în primele 3 zile pentru a se asigura că deciziile de eutanasiere sunt luate în timp util. Animalele utilizate în scopuri experimentale se evaluează în mod regulat în timpul perioadei de studiu pentru identificarea semnelor clinice de durere și/sau suferință (de exemplu, lovirea repetată cu piciorul, frecarea repetată a ochiului, clipire excesivă, lacrimare excesivă) (9) (10) (11), cel puțin de două ori pe zi, cu un interval de minim 6 de ore între observații sau mai des, dacă este necesar. Acest lucru este necesar (i) pentru a evalua în mod corespunzător animalele pentru a identifica semne de durere și suferință cu scopul a lua decizii în cunoștință de cauză cu privire la necesitatea de a mări doza de analgezice și (ii) pentru a evalua animalele pentru a identifica criteriile finale umane stabilite cu scopul de a lua decizii în cunoștință de cauză cu privire la adecvarea eutanasierii animalelor și pentru a se asigura că aceste decizii sunt luate în timp util. Colorarea cu fluoresceină se utilizează în mod obișnuit, iar atunci când se consideră necesar, se utilizează un biomicroscop cu lampă cu fantă (de exemplu, pentru evaluarea profunzimii leziunilor atunci când ulcerarea corneană este prezentă) ca adjuvant pentru detectarea și măsurarea leziunilor oculare și pentru a se evalua dacă au fost îndeplinite criteriile finale stabilite pentru eutanasiere în condiții umane.

▼M7

Fotografii digitale ale leziunilor observate pot fi colectate pentru referință și pentru a oferi o înregistrare permanentă a gradului de leziune oculară. Animalele nu se mențin în experiment mai mult decât este necesar pentru obținerea unor informații concludente. Animalele care prezintă semne profunde de durere sau suferință sunt eutanasiate imediat în condiții umane, iar substanța se evaluează în consecință.

Animalele care după instilare prezintă următoarele leziuni oculare sunt eutanasiate în condiții umane (a se vedea tabelul 1 pentru o descriere a punctării leziunilor): perforare corneană sau ulcerare corneană semnificativă, inclusiv stafilom; sânge în camera anterioară a ochiului; opacitate corneană de gradul 4; absența reflexului fotomotor (reacție a irisului de gradul 2) care persistă timp de 72 de ore; ulcerare a membranei conjunctivale; necroză a conjunctivelor și a membranei nictitante; sau desprinderea țesutului necrozat. Eutanasierea se justifică deoarece astfel de leziuni sunt, în general, ireversibile. În plus, se recomandă ca următoarele leziuni oculare să fie utilizate ca puncte finale umane pentru a încheia studiile planificate înainte de sfârșitul perioadei de observație de 21 de zile. Aceste leziuni sunt considerate predictive de leziuni iritante și corozive grave și leziuni care nu se preconizează a fi complet reversibile până la sfârșitul perioadei de observație de 21 de zile: profunzime gravă a leziunii (de exemplu, ulcerare corneană care se extinde dincolo de straturile stromale superficiale), distrugere a limbului în proporție de peste 50 % (după cum reiese din albirea țesutului conjunctival) și infecția oculară gravă (scurgere purulentă). O combinație de: vascularizare a suprafeței corneene (de exemplu, panus); suprafața colorării cu fluoresceină care nu se micșorează în timp, pe baza evaluărilor zilnice; și/sau lipsa de reepitelizare 5 zile după aplicarea substanței chimice de testat ar putea fi considerată, de asemenea, drept criterii posibil utile pentru a influența decizia clinică de a încheia prematur un studiu. Cu toate acestea, astfel de constatări, luate în considerare individual, sunt insuficiente pentru a justifica încheierea prematură a studiului. Odată ce au fost identificate efecte oculare severe, se consultă un medic veterinar curant sau calificat, specializat pe animale de laborator, sau personalul instruit pentru a identifica leziunile clinice pentru a efectua un examen clinic cu scopul de a determina dacă o combinație a acestor efecte justifică încheierea prematură a studiului. Nivelurile reacției oculare (conjunctivă, cornee și iris) se obțin și se înregistrează la 1, 24, 48 și 72 de ore de la aplicarea substanței chimice de testat (tabelul 1). Animalele care nu prezintă leziuni oculare pot fi eutanasiate după cel puțin 3 zile de la instilare. Animale cu leziuni oculare care nu sunt atât de grave sunt supuse observației până la dispariția leziunilor sau timp de 21 de zile, moment în care studiul se încheie. Observațiile se efectuează și se înregistrează la un minim de 1 oră, 24 de ore, 48 de ore, 72 de ore, 7 zile, 14 zile și 21 de zile pentru a determina starea și reversibilitatea sau ireversibilitatea leziunilor. Observații mai frecvente se efectuează, dacă este necesar, pentru a stabili dacă animalul testat se eutanasiază din considerente umane sau este eliminat din studiu din cauza rezultatelor negative.

Nivelurile leziunilor oculare (tabelul 1) se înregistrează la fiecare examinare. Se înregistrează, de asemenea, orice altă leziune oculară (de exemplu, panus, colorare, modificări în camera anterioară) sau efecte sistemice adverse.

Pentru a facilita examinarea reacțiilor, se poate utiliza o lupă binoculară, o lampă portabilă cu fantă, un biomicroscop sau un alt dispozitiv adecvat. După înregistrarea observațiilor la 24 de ore, ochii pot fi examinați în continuare cu ajutorul fluoresceinei.

Punctarea reacțiilor oculare este, în mod evident, subiectivă. Pentru a promova armonizarea punctării reacțiilor oculare și pentru a veni în sprijinul laboratoarelor de testare și al persoanelor implicate în efectuarea și interpretarea observațiilor, personalul care efectuează observațiile trebuie să fie instruit corespunzător cu privire la sistemul de examinare utilizat.

▼M7

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea rezultatelor

Punctajele iritației oculare se evaluează în legătură cu natura și gravitatea leziunilor, precum și cu reversibilitatea sau ireversibilitatea acestora. Punctajele individuale nu reprezintă un standard absolut pentru proprietățile iritante ale unei substanțe chimice, întrucât se evaluează și alte efecte ale substanței chimice de testat. În schimb, punctajele individuale trebuie privite ca valori de referință și sunt semnificative doar dacă sunt însoțite de o descriere și o evaluare completă a tuturor observațiilor.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Motivația pentru testarea in vivo: analiza valorii probante a datelor existente din teste anterioare, inclusiv a rezultatelor strategiei de testare secvențiale:

— descrierea datelor relevante disponibile din testele anterioare;

— date derivate la fiecare etapă a strategiei de testare;

— descrierea testelor *in vitro* efectuate, inclusiv detalii privind procedurile, rezultatele obținute cu substanțele chimice de testat/de referință;

— descrierea studiului *in vivo* de iritație/coroziune dermică efectuat, inclusiv rezultatele obținute;

— analiza valorii probante a datelor pentru efectuarea studiului *in vivo*.

Substanța chimică de testat:

— date de identificare (de exemplu, denumirea chimică și numărul CAS, dacă este disponibil, puritate, impurități cunoscute, sursă, numărul lotului);

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice (de exemplu, pH, solubilitate, stabilitate, reactivitatea cu apă);

— în cazul unui amestec, se identifică componentele, inclusiv datele de identificare ale substanțelor constituente (de exemplu, denumiri chimice și, dacă sunt disponibile, numerele CAS) și concentrațiile lor;

— doza aplicată.

Vehicul:

— identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;

— justificarea alegerii vehiculului.

Animalele de experiență:

— specie/șușă utilizată, motivație pentru utilizarea altor animale decât iepurele albinos;

— vârsta fiecărui animal la începutul studiului;

— numărul de animale de fiecare sex participante la test și în grupurile martor (dacă este necesar);

— greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.

▼M7

Anestezice și analgezice

— dozele și intervalele în care au fost administrate anestezice topice și analgezice sistemice;

— în cazul în care este utilizat anestezic local, identificarea, puritatea, tipul și potențiala interacțiune cu substanța chimică de testat.

Rezultate:

— descrierea metodei utilizate pentru punctarea iritației în fiecare moment de observare (de exemplu, lampă portabilă cu fantă, biomicroscop, fluoresceină);

— un tabel cu datele privind reacțiile iritante/corozive la fiecare animal în fiecare moment de observare, până la excluderea din test a fiecărui animal;

— o descriere narativă a gravității și a naturii iritației sau coroziunii observate;

— o descriere a oricăror alte leziuni observate la nivel ocular (de exemplu, vascularizare, formarea unui panus, aderențe, colorare);

— descrierea efectelor adverse locale nonoculare și sistemice, înregistrări ale semnelor clinice de durere și suferință, fotografii digitale și concluzii ale examenului histopatologic, dacă sunt disponibile.

Discutarea rezultatelor.

Interpretarea rezultatelor

Extrapolarea rezultatelor studiilor de iritație oculară asupra animalelor la oameni este valabilă doar într-o măsură restrânsă. În multe cazuri, iepurele albinos este mai sensibil decât oamenii la substanțe cu proprietăți iritante sau corozive la nivel ocular.

La interpretarea datelor se acordă o atenție deosebită excluderii iritației generate de infecții secundare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 – 429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 – 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, p.483 – 524.

(7) Capitolul B.4 din prezenta anexă, *Iritație/Coroziune dermică acută*.

▼**M7**

(8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing,NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Capitolul B.40 din prezenta anexă,*Coroziunea cutanată in vitro: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)*.

(14) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, *Coroziune cutanată in vitro: Testare pe un model de piele umană*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Capitolul B.47 din prezenta anexă, *Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă*.

(17) Capitolul B.48 din prezenta anexă, metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.

(20) EC (2008), Regulation (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.

(21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Tabelul 1

Punctarea leziunilor oculare

Cornee	Grad
Opacitate: nivel de densitate (examinarea se face în zona cea mai densă) (*)	
Fără ulcerare sau opacitate	0
Zone dispersate sau difuze de opacitate (altele decât o ușoară atenuare a strălucirii normale); detaliile irisului clar vizibile	1
Zonă translucidă ușor perceptibilă; detaliile irisului ușor mascate	2
Zonă sidefată; detaliile irisului invizibile; dimensiunea pupilei greu perceptibilă	3
Cornee opacă; iris invizibil din cauza opacității	4
Maximum posibil: 4	
Iris	
Normal	0
Pliuri vizibil mai adânci, congestie, tumefiere, hiperemie pericorneană moderată; sau injectare; iris reactiv la lumină (o reacție lentă este considerată a fi un efect)	1
Hemoragie, distrugere marcată sau absența reacției la lumină	2
Maximum posibil: 2	
Conjunctiva	
Roșeață (se aplică conjunctivelor palpebrală și oculară; fără cornee și iris)	
Normal	0
Hiperemie evidentă a anumitor vase sanguine (ochi injectați)	1
Colorație purpurie difuză; vasele individuale greu perceptibile	2
Colorație roșie susținută difuză	3
Maximum posibil: 3	
Chemosis	
Tumefiere (se referă la pleoape și/sau la membranele nictitante)	
Normal	0
Tumefiere superioară stării normale	1
Tumefiere evidentă, cu eversiunea parțială a pleoapelor	2
Tumefiere cu pleoapele aproape pe jumătate închise	3
Tumefiere cu pleoape mai mult decât jumătate închise	4
Maximum posibil: 4	

(*) Suprafața cu opacitate corneană se notează

▼M7

Apendice

DEFINIȚII

Rezerva acidă/alcalină: Pentru preparatele acide, aceasta este cantitatea (g) de hidroxid de sodiu/100 g de preparat necesar pentru a produce un anumit pH. Pentru preparatele alcaline, aceasta este cantitatea (g) de hidroxid de sodiu echivalent cu g de acid sulfuric/100 g de preparat necesar pentru a produce un anumit pH (Young *et al*. 1988).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Substanță neiritantă: Substanțe care nu sunt încadrate în categoriile EPA I, II, sau III de iritanți oculari; sau categoriile GHS 1, 2, 2A, sau 2B de iritanți pentru ochi; sau categoriile UE 1 sau 2 (17) (18) (19).

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) O substanță chimică care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivelul ochiului; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoria GHS 1 de iritanți pentru ochi, sau categoria EPA I de iritanți oculari sau categoria UE 1 de iritanți oculari (17) (18) (19).

Iritant ocular: (a) Substanță chimică care produce o modificare reversibilă la nivelul ochiului; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoriile EPA II sau III de iritanți oculari; sau categoriile GHS 2, 2A sau 2B de iritanți pentru ochi; sau categoria UE 2 (17) (18) (19).

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță chimică care provoacă lezarea tisulară la nivelul ochiului care nu se vindecă în 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o slăbire fizică severă a vederii; (b) Substanțe chimice care se încadrează în categoria GHS 1 de iritanți pentru ochi sau categoria EPA I de iritanți oculari sau categoria UE 1 (17) (18) (19).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Abordare secvențială: O strategie de testare în trepte în cadrul căreia toate informațiile existente privind o substanță chimică de testat sunt revizuite într-o anumită ordine utilizând un proces de evaluare a forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscului, înainte de a trece la etapa următoare. Dacă potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. Dacă potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Valoare probantă a datelor (proces): Punctele forte și punctele slabe ale unui set de informații sunt utilizate ca bază pentru o concluzie care nu poate evidentă din datele individuale.

▼M7

SUPLIMENT LA METODA DE TESTARE B.5 ([1])

O STRATEGIE DE TESTARE SECVENȚIALĂ PENTRU IRITAȚIA ȘI COROZIUNEA OCULARĂ

Considerente generale

În interesul acurateței științifice și al bunăstării animalelor, este important să se evite utilizarea inutilă a animalelor de experiență și să se reducă la minimum testările care pot produce reacții grave la animale. Este necesar să se evalueze toate informațiile privind o substanță chimică care sunt relevante pentru potențialul caracter coroziv /iritant la nivel ocular al acesteia înainte de a lua în considerare testarea *in vivo*. Este posibil să existe deja date suficiente pentru clasificarea unei substanțe chimice de testat în ceea ce privește potențialul său coroziv sau iritant la nivel ocular, fără a mai fi necesar să se efectueze teste pe animale de laborator. Prin urmare, prin utilizarea unei analize a valorii probante a datelor și a unei strategii de testare secvențiale se reduce la minimum necesitatea de a efectua teste *in vivo*, în special dacă substanța chimică are potențialul de a produce reacții grave.

Se recomandă utilizarea unei analize a valorii probante a datelor pentru a evalua informațiile existente privind potențialul iritant și coroziv la nivel ocular al substanțelor chimice și pentru a se stabili dacă este necesară efectuarea unor studii suplimentare, altele decât studii oculare *in vivo*, pentru caracterizarea acestui potențial. Dacă sunt necesare studii suplimentare, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor experimentale relevante. Pentru substanțele care nu au fost testate anterior, se recomandă aplicarea strategiei de testare secvențiale pentru obținerea datelor necesare pentru evaluarea potențialului său coroziv/iritant la nivel ocular. Inițial, strategia de testare descrisă în prezentul supliment a fost dezvoltată în cadrul unui atelier de lucru OCDE (1). Ulterior, aceasta a fost susținută și extinsă în cadrul Sistemului armonizat integrat de clasificare a riscurilor substanțelor chimice pentru sănătatea oamenilor și mediu, adoptat la cea de a 28-a reuniune comună a Comitetului pentru substanțe chimice și a Grupului de lucru pentru substanțe chimice, în noiembrie 1998 (2), și actualizat de un grup de experți OCDE în anul 2011.

Cu toate că această strategie de testare nu face parte integrantă din metoda de testare B.5, aceasta reprezintă abordarea recomandată pentru determinarea caracteristicilor iritante/corozive la nivel ocular. Această abordare reprezintă atât cea mai bună practică, cât și un reper etic pentru testarea *in vivo* pentru iritație/coroziune oculară. Metoda de testare oferă indicații pentru efectuarea testului *in vivo* și rezumă factorii care trebuie evaluați înainte de un astfel de test. Strategia de testare secvențială oferă o abordare a valorii probante pentru evaluarea datelor existente privind proprietățile iritante/corozive la nivel ocular ale substanțelor chimice și o abordare graduală pentru generarea datelor relevante pentru substanțele chimice pentru care sunt necesare studii suplimentare sau care nu au făcut încă obiectul unor studii. Strategia include, într-o primă etapă, efectuarea unor teste *in vitro* sau *ex vivo* validate și acceptate, iar apoi aplicarea metodei de testare MT B.4 în condiții specifice (3) (4).

Descrierea strategiei de testare secvențiale

Înainte de efectuarea testelor incluse în strategia de testare secvențială (figură), se evaluează toate informațiile disponibile pentru a stabili dacă este necesară testarea oculară *in vivo*. Cu toate că se pot obține informații semnificative din evaluarea unor parametri specifici (de exemplu, o valoare extremă a pH-ului), se iau în considerare toate informațiile existente. Se evaluează toate datele relevante privind efectele substanței chimice în cauză și a analogilor săi pentru adoptarea unei decizii prin analiza valorii probante și se prezintă motivele care stau la baza deciziei. Se acordă o atenție specială datelor privind efectele substanței chimice

([1]) Pentru utilizarea unei strategii de testare integrate pentru iritația oculară în temeiul REACH, a se vedea, de asemenea, Orientarea ECHA Cerințe privind informațiile și evaluarea securității chimice, capitolul R.7a: Orientări specifice parametrilor http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf.

▼M7

asupra oamenilor și animalelor, urmate de rezultatele testelor *in vitro* sau *ex vivo*. Se evită, ori de câte ori este posibil, efectuarea unor studii in vivo pentru substanțele chimice corozive. Factorii luați în considerare în strategia de testare includ:

Evaluarea datelor existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau a datelor privind testarea in vitro din metode validate și acceptate la nivel internațional (etapa 1).

Se iau în primul rând în considerare datele existente privind efectele asupra oamenilor, de exemplu studii clinice și ocupaționale și studii de caz și/sau date obținute din studii oculare asupra animalelor și/sau date in vitro din metode validate și acceptate la nivel internațional pentru iritarea/coroziunea la nivel ocular, întrucât acestea furnizează informații direct legate de efectele asupra ochilor. În continuare, se evaluează datele disponibile din studii de coroziune/iritație dermică asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau din studiile in vitro din metode validate și acceptate la nivel internațional pentru coroziunea cutanată. Nu se instilează în ochii animalelor substanțe chimice având un caracter coroziv sau un potențial iritant sever cunoscut la nivel ocular sau substanțe chimice care prezintă efecte corozive sau puternic iritante la nivel dermic; astfel de substanțe chimice sunt considerate a fi corozive și/sau iritante, de asemenea, la nivel ocular. De asemenea, nu este necesară efectuarea de studii in vivo asupra substanțelor chimice pentru care există date suficiente obținute din studii oculare anterioare care atestă caracterul necoroziv sau neiritant.

Analiza relațiilor structură-activitate (RSA) (etapa 2).

Se iau în considerare rezultatele testelor asupra substanțelor chimice înrudite din punct de vedere structural, dacă sunt disponibile. În cazul în care sunt disponibile suficiente date privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor ale unor substanțe înrudite structural sau ale unor amestecuri de astfel de substanțe care indică un potențial coroziv/iritant la nivel ocular, se poate presupune că substanța chimică de testat în curs de evaluare va produce aceleași reacții. În astfel de cazuri, este posibil să nu fie necesare teste privind substanța chimică în cauză. Datele negative obținute de studiile asupra substanțelor înrudite structural sau asupra amestecurilor de astfel de substanțe nu constituie dovezi suficiente pentru caracterul necoroziv/neiritant al substanței chimice supuse strategiei de testare secvențiale. Se utilizează abordări RSA validate și acceptate pentru a identifica potențialul coroziv și iritant atât la nivel dermic, cât și la nivel ocular.

Proprietățile fizico-chimice și reactivitatea chimică (etapa 3).

Substanțele care prezintă valori extreme ale pH-ului precum $\leq$2,0 sau $\geq$11,5 pot produce efecte locale puternice. În cazul în care valorile extreme ale pH-ului constituie baza pentru identificarea unei substanțe chimice ca fiind corozivă sau iritantă la nivel ocular, se poate lua în considerare, de asemenea, rezerva sa acidă/alcalină (capacitatea de tamponare) (5) (6) (7). În cazul în care capacitatea de tamponare sugerează că este posibil ca o substanță chimică să nu fie corozivă la nivel ocular (de exemplu, substanțele chimice cu o valoare extremă a pH-ului și rezervă acidă/alcalină scăzută), se efectuează teste suplimentare pentru confirmare, de preferat prin utilizarea unui test in vitro sau ex vivo validat și acceptat (a se vedea punctul 10).

Analiza altor informații existente (etapa 4).

În această etapă se evaluează toate informațiile disponibile privind toxicitatea sistemică prin absorbție cutanată. Toxicitatea dermică acută a substanței chimice de testat trebuie să fie, de asemenea, luată în considerare. În cazul în care substanța chimică de testat s-a dovedit foarte toxică prin absorbție cutanată, este posibil să nu fie necesare teste oculare. În timp ce nu există în mod obligatoriu o relație între toxicitate dermică acută și iritația/coroziunea oculară, se

▼M7

poate presupune că un agent foarte toxic prin absorbție cutanată va prezenta o toxicitate ridicată la instilarea în ochi. Astfel de date pot fi analizate, de asemenea, între etapele 2 și 3.

Evaluarea corozivității cutanate a substanței chimice în cazul în care este necesară, de asemenea, în scopuri de reglementare (etapa 5).

În primul rând, trebuie evaluată coroziunea cutanată și potențialul sever de iritare în conformitate cu metoda de testare B.4 (4) și suplimentul aferent (8), inclusiv utilizarea metodelor de testare in vitro a coroziunii cutanate validate și acceptate la nivel internațional (9) (10) (11). În cazul în care se demonstrează că substanța chimică produce coroziune sau iritație puternică la nivel dermic, aceasta poate fi considerată, de asemenea, corozivă sau puternic iritantă la nivel ocular. Prin urmare, nu sunt necesare teste suplimentare. În cazul în care substanța chimică nu este corozivă sau puternic iritantă la nivel dermic, se efectuează un test ocular in vitro sau ex vivo.

Rezultatele testelor in vitro sau ex vivo (etapa 6).

Substanțele chimice care au prezentat proprietăți corozive sau puternic iritante într-un test in vitro sau ex vivo (12) (13) validat și acceptat la nivel internațional pentru evaluarea specifică a coroziunii/iritației la nivel ocular nu trebuie să fie testate pe animale. Se poate presupune că substanțele chimice în cauză vor produce efecte similare grave in vivo. În cazul în care nu sunt disponibile teste in vitro/ex vivo validate și acceptate, se trece peste etapa 6 și se continuă direct cu etapa 7.

Testul in vivo pe iepuri (etapele 7 și 8):

Testul ocular in vivo începe cu un test inițial efectuat pe un singur animal. În cazul în care rezultatele acestui test indică faptul că substanța chimică este puternic iritantă sau corozivă la nivel ocular, nu se efectuează teste suplimentare. În cazul în care testul nu relevă efecte corozive sau puternic iritante, se efectuează un test de confirmare pe alte două animale. În funcție de rezultatele testului de confirmare, pot fi necesare teste suplimentare. [a se vedea metoda de testare B.5]

▼M7

STRATEGIE DE TESTARE ȘI EVALUARE A IRITAȚIEI/COROZIUNII OCULARE

	Activitate	Constatare	Concluzie
1	Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode *in vitro* validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte la nivel ocular	Leziuni oculare grave	Efect extrem; substanță considerată corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste.
		Iritantă la nivel ocular	Efect extrem; substanță considerată iritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste.
		Necorozivă și neiritantă la nivel ocular	Efect extrem; substanță considerată necorozivă și neiritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste.
	Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode *in vitro* validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte corozive la nivel dermic	Corozivă la nivel dermic	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	Date existente privind efectele asupra oamenilor și/sau animalelor și/sau date provenite din metode *in vitro* validate și acceptate la nivel internațional care indică efecte puternic iritante la nivel dermic	Puternic iritantă la nivel dermic	Iritație oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	Nu sunt disponibile informații sau informațiile disponibile sunt neconcludente		
	↓		
2	Se efectuează analiza RSA pentru coroziune/iritație oculară	Se prevăd leziuni oculare grave	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
		Se prevede iritație oculară	Iritație oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	Se ia în considerare analiza RSA pentru coroziune dermică	Se prevede coroziune dermică	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	Nu se pot face prezumții sau prezumțiile sunt neconcludente sau negative		
	↓		
3	Se măsoară pH-ul (capacitatea de tamponare, dacă este relevantă)	pH $\leq$ 2 sau $\geq$ 11,5 (cu o capacitate de tamponare ridicată, dacă este relevantă)	Coroziune oculară prezumată. Nu sunt necesare teste.
	↓		
	2 < pH < 11,5 sau pH $\leq$ 2,0 sau $\geq$ 11,5 cu o capacitate de tamponare redusă, dacă este relevantă		
	↓		
4	Se ia în considerare toxicitatea sistemică prin absorbție cutanată	Foarte toxică la concentrațiile care ar fi utilizate în testarea oculară.	Substanța chimică ar fi prea toxică pentru testare. Nu sunt necesare teste.

▼M7

	Activitate	Constatare	Concluzie
	↓		
	Nu sunt disponibile astfel de informații sau substanța chimică nu este foarte toxică		
	↓		
5	Se evaluează potențialul de coroziune cutanată, cu titlu experimental, în conformitate cu strategia de testare din capitolul B.4 din prezenta anexă, în cazul în care este necesar în scopuri de reglementare	Reacție corozivă sau cu potențial iritant sever	Se presupune corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓		
	Substanța chimică nu este corozivă sau puternic iritantă pentru piele		
	↓		
6	Să efectueze test(e) *in vitro* sau *ex vivo* validat(e) și acceptat(e) la nivel ocular	Reacție corozivă sau cu potențial iritant sever	Se presupune corozivă sau sever iritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul efectuat să poată fi utilizat pentru a identifica substanțele cu caracter coroziv/sever iritant, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului. Nu sunt necesare teste suplimentare.
		Reacție iritantă	Se presupune iritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul (testele) realizat(e) să poată fi utilizat(e) pentru a identifica în mod corect substanțele cu potențial coroziv, sever iritant și iritant, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului (testelor). Nu sunt necesare teste suplimentare.
		Reacție neiritantă	Se presupune neiritantă la nivel ocular, cu condiția ca testul (testele) realizat(e) să poată fi utilizat(e) pentru a identifica în mod corect substanțele cu caracter neiritant, să distingă în mod corect aceste substanțe de substanțele chimice iritante, sever iritante sau corozive la nivel ocular, iar substanța chimică să se încadreze în domeniul de aplicabilitate al testului. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓		
	Testul (testele) in vitro sau ex vivo la nivel ocular validat(e) și acceptat(e) nu poate (pot) fi utilizat(e) pentru a ajunge la o concluzie		
	↓		

▼M7

	Activitate	Constatare	Concluzie
7	Se efectuează testul inițial *in vivo* pe ochi de iepure, pe un singur animal	Leziuni oculare grave	Substanță considerată corozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.
	↓		
	Fără leziuni grave sau fără răspuns		
	↓		
8	Se efectuează testul de confirmare pe unul sau două animale suplimentare	Substanță corozivă sau iritantă	Substanță considerată corozivă sau iritantă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.
		Substanță necorozivă sau iritantă	Substanță considerată neiritantă și necorozivă la nivel ocular. Nu sunt necesare teste suplimentare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 – 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune dermică acută.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 – 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, p.483 – 524.

(7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(8) Suplimentul la capitolul B.4 din prezenta anexă, O strategie de testare secvențială pentru iritația și coroziunea oculară.

(9) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET).

(10) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*; Testare pe un model de piele umană.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Capitolul B.47 din prezenta anexă, Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea *i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă*.

(13) Capitolul B.48 din prezenta anexă, Metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea *i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă*.

▼B

B.6. SENSIBILIZARE CUTANATĂ

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Observații

Sensibilitatea și capacitatea testelor de a detecta substanțele capabile să provoace o sensibilizare cutanată la om reprezintă criterii importante în sistemul de clasificare a toxicității din motive de sănătate publică.

Nu există o metodă de testare unică care să permită identificarea adecvată a tuturor substanțelor cu un potențial de sensibilizare cutanată la om și care să fie aplicabilă tuturor substanțelor.

Diverși factori, cum ar fi proprietățile fizice ale unei substanțe, inclusiv capacitatea sa de a penetra pielea, trebuie luați în considerare atunci când se alege metoda de testare.

Au fost dezvoltate două tipuri de teste la care se folosesc cobai: pe de o parte, testele cu adjuvant la care starea alergică este potențializată prin dizolvarea sau suspendarea substanței testate în adjuvantul complet Freund (ADF) și fără adjuvant, pe de altă parte.

Testele cu folosirea adjuvantului au o capacitate mai bună de evidențiere a potențialul de sensibilizare cutanată a substanței testate și o mai mare precizie decât testele care nu utilizează adjuvantul complet Freund.

Testul de maximizare la cobai (GPMT: Guinea Pig Maximisation Test) este un test cu adjuvant foarte răspândit. Cu toate că există mai multe metode pentru detectarea potențialului de sensibilizare cutanată, testul GPMT este testul cu adjuvant folosit cu predilecție.

Testele fără adjuvant (testul Buehler este de preferat) sunt considerate a fi mai puțin sensibile în ceea ce privește numeroase clase de produse chimice.

În unele cazuri există motive întemeiate în vederea alegerii testului Buehler, care constă într-o aplicare topică, pe când testul de maximizare necesită o injecție intradermică. Utilizarea testului Buehler trebuie justificată din punct de vedere științific.

Testul de maximizare la cobai GMPT și testul Buehler sunt descrise în cadrul acestei metode. Se pot folosi și alte metode, cu condiția ca ele să fi fost validate în mod corespunzător, iar utilizarea lor să fie argumentată din punct de vedere științific.

Dacă se obține un rezultat pozitiv în cadrul unui test de depistare recunoscut, substanța poate fi considerată ca potențial sensibilizantă și se poate să nu mai fie necesară efectuarea unui test suplimentar pe cobai. Cu toate acestea, dacă s-a obținut un test negativ într-un asemenea test, trebuie efectuat un test pe cobai, utilizându-se procedura descrisă la prezenta metodă de testare.

A se vedea și introducerea generală, partea B.

▼B

1.2. DEFINIȚII

Sensibilizarea cutanată (dermatita alergică de contact) reprezintă o reacție imunologică cutanată la o substanță. La om, reacția se poate caracteriza prin apariția pruritului, a unui eritem, al unui edem, a unor vezicule sau papule sau prin asocierea acestor manifestări. La alte specii, reacția poate fi diferită și se poate manifesta doar sub forma unor eriteme sau edeme.

Expunere de inducție: expunere experimentală a unui subiect la o substanță cu scopul de a provoca o hipersensibilitate.

Perioadă de inducție: o perioadă de cel puțin o săptămână după expunerea de inducție, în cursul căreia poate apărea o stare de hipersensibilitate.

Expunere de declanșare: expunere experimentală, după o perioadă de inducție, a unui subiect expus în prealabil substanței respective, cu scopul de a verifica dacă subiectul va avea o reacție hipersenzitivă.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Sensibilitatea și fiabilitatea tehnicii de testare utilizate trebuie să fie verificate din șase în șase luni, cu ajutorul unor substanțe care au proprietăți cunoscute de sensibilizare cutanată de la slab la moderat.

La testele efectuate în mod corect, substanțele cu proprietăți sensibilizante slabe sau moderate provoacă în mod normal o reacție la cel puțin 30 % dintre animale, la metodele cu adjuvant și la 15 % dintre ele, la metodele fără adjuvant.

Se vor utiliza, de preferință, următoarele substanțe.

Număr CAS	Număr EINECS	Denumire EINECS	Denumire uzuală
101-86-0	202-983-3	α-hexilcinamaldehidă	α-hexilcinamaldehidă
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (mercaptobenzotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocaină	nordcaină

În unele cazuri justificate în mod suficient, se pot folosi și alte substanțe martor, care să răspundă criteriilor de mai sus.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Inițial animalele de experiență sunt expuse substanței testate printr-o injecție intradermică și/sau prin aplicare epidermică (expunere de inducție). După o perioadă de odihnă de la 10 la 14 zile (perioada de inducție) în cursul căreia se poate produce o reacție imunitară, animalele sunt supuse unei doze de declanșare. Suprafața și intensitatea reacției cutanate a animalelor se compară cu cele ale animalelor martor cărora li s-a administrat placebo cu ocazia inducerii și care au fost supuse expunerii de declanșare.

1.5. DESCRIEREA METODELOR DE TESTARE

Dacă se dovedește necesară eliminarea substanței testate, acest lucru se va face utilizându-se apă sau un solvent adecvat, astfel încât să nu se modifice reacția existentă sau integritatea epidermei.

▼B

1.5.1. *Testul de maximizare la cobai (GMPT)*

1.5.1.1. Pregătirea testului

Exemplare tinere de cobai albinoși, în stare bună de sănătate, se aclimatizează în condițiile de laborator, cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului. Înainte de începerea testului, animalele sunt distribuite aleator în grupuri care urmează a fi tratate și loturi martor. Blana va fi tunsă, rasă sau epilată chimic, în funcție de metoda utilizată. Pielea animalelor nu trebuie să fie jupuită. Animalele sunt cântărite, atât înaintea începerii testului, precum și după încheierea acestuia.

1.5.1.2. Condiții de testare

1.5.1.2.1. Animalele de experiență

Linii pure de cobai albinos folosite în mod curent în laboratoare.

1.5.1.2.2. Număr și sex

Se vor folosi animale de același sex, indiferent care este acesta. Dacă se vor folosi femele, acestea trebuie să fie nulipare și nu trebuie să fie însărcinate.

Se vor folosi minimum 10 animale în grupul tratat și cel puțin 5 în lotul martor. Dacă grupul tratat constă din mai puțin de 20 de animale, iar lotul martor din mai puțin de 10 și dacă în urma testului nu s-a putut conclude că substanța testată este o substanță sensibilizantă, se recomandă utilizarea și a altor animale pentru a se ajunge la un număr total de cel puțin 20 de animale de experiență și 10 martor.

1.5.1.2.3. Doze

Concentrația de substanță administrată la expunerea de inducție trebuie să fie bine tolerată de organismul animalelor și trebuie să corespundă concentrației maxime care provoacă o iritație cutanată ușoară și moderată. Concentrația folosită pentru expunerea de declanșare trebuie să corespundă concentrației maxime care nu provoacă nicio iritație. Dacă este necesar, concentrațiile adecvate pot fi determinate pe baza unui test-pilot pe două sau pe trei animale. În acest scop, se vor utiliza animale tratate cu adjuvantul complet Freund.

1.5.1.3. Procedură

1.5.1.3.1. Inducerea

Ziua 0 – grupul tratat

Trei serii de injecții intradermice de un volum de câte 0,1 ml fiecare se vor administra în regiunea scapulară de unde a fost îndepărtată blana, în prealabil, de o parte și de cealaltă a liniei mediane.

Injecția 1: amestec 1:1 (v/v) adjuvant complet Freund/apă sau ser fiziologic

Injecția 2: substanța testată într-un vehicul adecvat la concentrația aleasă

Injecția 3: substanța de testat la concentrația dorită, amestec 1:1 (v/v) cu adjuvantul complet Freund sau cu ser fiziologic

La injecția 3, substanțele solubile în apă sunt dizolvate în faza apoasă înainte de a fi amestecate cu adjuvantul complet Freund sau cu serul fiziologic. Substanțele liposolubile sau insolubile sunt mai întâi suspendate în adjuvantul complet Freund și mai apoi în faza apoasă. Concentrația finală a substanței testate trebuie să fie egală cu cea utilizată la injecția 2.

▼B

Injecțiile 1 și 2 sunt administrate aproape una de cealaltă și cât mai aproape de cap, iar injecția 3 va fi administrată spre partea caudală a zonei de testare.

Ziua 0 – lotul martor

Trei serii de câte două injecții intradermice cu un volum de câte 0,1 ml fiecare se vor administra în aceeași regiune ca la animalele tratate.

Injecția 1: amestec 1:1 (v/v) adjuvant complet Freund/apă sau ser fiziologic

Injecția 2: vehiculul nediluat

Injecția 3: formulă de 50 % a vehiculului într-un amestec 1:1 (v/v) adjuvantul complet Freund/apă sau cu ser fiziologic

Ziua 5-7 – grupul tratat, lotul martor

Aproximativ cu 24 de ore înainte de aplicarea topică de inducție și în cazul în care substanța nu a provocat iritații cutanate, zona de testare rasă și/sau tunsă va fi tratată cu 0,5 ml de sulfat de lauril de sodiu în concentrație de 10 % în vaselină, astfel încât să se provoace o iritație locală.

Ziua 6-8 – grupul tratat

De pe zona de testare se îndepărtează din nou blana. O bucată de hârtie de filtru (2 × 4 cm) îmbibată cu substanța testată și cu vehiculul adecvat se aplică pe zona de testare și se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament oclusiv, timp de 48 de ore. Alegerea vehiculului trebuie justificată. Substanțele solide sunt pulverizate și incorporate într-un vehicul adecvat; eventual, substanțele lichide pot fi aplicate direct.

Ziua 6-8 – lotul martor

De pe zona de testare se îndepărtează din nou blana. Se aplică doar vehiculul pe zona de testare, după indicațiile de mai sus și se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament oclusiv, timp de 48 de ore.

1.5.1.3.2. Declanșare

Ziua 20-22 – grupul tratat și lotul martor

Se îndepărtează blana de pe șoldurile animalelor tratate și de pe șoldurile animalelor martor. Un plasture sau o capsulă îmbibate cu substanța testată se aplică pe unul dintre șoldurile animalelor și dacă este necesar, un plasture sau o capsulă îmbibate doar cu vehicul se aplică pe celălalt șold. Plasturele se vor menține în contact cu pielea timp de 24 de ore cu ajutorul unui pansament oclusiv.

Examinare și cotare: grupul tratat și lotul martor

— la aproximativ 21 de ore după înlăturarea plasturelui, zona de testare se curăță și se rade și/sau se tunde și se epilează dacă este necesar;

— aproximativ 3 ore mai târziu (aproximativ la 48 de ore după începutul aplicării dozei de declanșare), reacția cutanată este examinată și cotată pe baza scalei indicate în apendice;

— aproximativ 24 de ore după această examinare, urmează o nouă perioadă de examinare (la 72 ore) și o nouă cotare.

Se recomandă o citire oarbă a animalelor din ambele grupuri.

Dacă este necesară precizarea rezultatelor obținute cu ocazia primei expuneri de declanșare, o a doua expunere în vederea declanșării unei reacții (și anume o redeclanșare), eventual cu un alt lot martor, poate fi avută în vedere, aproximativ cu o săptămână după prima expunere. Noua expunere în vederea declanșării unei reacții se poate efectua, de asemenea, pe lotul martor inițial.

▼B

Toate observațiile și toate reacțiile cutanate, inclusiv cele sistemice, ca urmare a unei expuneri de inducție sau de declanșare trebuie examinate și cotate pe baza scalei Magnusson/Kligman (a se vedea apendicele). Alte tehnici, cum ar fi examinarea histopatologică sau măsurarea pliului cutanat, pot fi folosite la descrierea unor reacții îndoielnice.

1.5.2. *Testul Buehler*

1.5.2.1. Pregătirea testului

Exemplare tinere de cobai albinoși, în stare bună de sănătate, sunt lăsați să se aclimatizeze la condițiile de laborator cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului. Înainte de începerea testului, animalele sunt distribuite aleator în grupuri care urmează a fi tratate și grupuri martor. Blana va fi tunsă, rasă sau epilată chimic, în funcție de metoda utilizată. Pielea animalelor nu trebuie să fie jupuită. Animalele sunt cântărite atât înainte de începerea testului, precum și după încheierea acestuia.

1.5.2.2. Condiții de testare

1.5.2.2.1. Animalele de experiență

Linii pure de cobai albinos folosite în mod curent în laboratoare.

1.5.2.2.2. Număr și sex

Se vor folosi animale de același sex, indiferent care este acesta. Dacă se vor folosi femele, acestea trebuie să fie nulipare și nu trebuie să fie însărcinate.

Se vor folosi minimum 20 animale în grupul tratat și cel puțin 10 în lotul martor.

1.5.2.2.3. Doze

Concentrația de substanță administrată la expunerea de inducție trebuie să corespundă concentrației maxime care provoacă o iritație cutanată moderată, dar nu exagerată. Concentrația folosită pentru expunerea de declanșare trebuie să corespundă concentrației maxime care nu provoacă nicio iritație. Dacă este necesar, concentrațiile potrivite pot fi determinate pe baza unui test-pilot pe două sau pe trei animale.

La substanțele hidrosolubile se va folosi apa ca vehicul sau o soluție diluată neiritantă de surfactant. La celelalte substanțe, se va utiliza de preferință un amestec de etanol de 80 % în apă, la inducere și de acetonă la declanșare.

1.5.2.3. Procedură

1.5.2.3.1. Inducerea

Ziua 0 – grupul tratat

Se îndepărtează blana de pe unul din șoldurile animalelor. Compresa care va servi la efectuarea testului se îmbibă cu substanța testată, incorporată într-un vehicul adecvat (alegerea vehiculului trebuie justificată; dacă este necesar, substanțele lichide pot fi aplicate în mod direct).

Compresa se aplică pe zona de testare și se menține în contact cu pielea timp de 6 ore cu ajutorul unui plasture oclusiv sau al unei capsule și al unui pansament potrivit.

▼B

Sistemul trebuie să fie oclusiv. Un tampon de vată circular sau pătrat de 4-6 cm^2 este potrivit. Se va utiliza de preferință un dispozitiv de asigurare a etanșeității plasturelui pentru a asigura caracterul oclusiv. Dacă au fost folosite pansamente, o expunere suplimentară poate fi necesară.

Ziua 0 – lotul martor

Se îndepărtează blana de pe unul din șoldurile animalelor. Se aplică doar vehiculul pe zona de testare, după indicațiile de mai sus, la animalele tratate. Compresa care servește la realizarea testului se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui plasture oclusiv sau al unei capsule și al unui pansament potrivit. Dacă se poate demonstra faptul că simularea tratamentului pe lotul martor nu este necesară, această etapă poate fi omisă, utilizându-se un lot martor căruia nu i se administrează nimic.

Zilele 6-8 și 13-15 – grupul tratat și lotul martor

Același tratament ca cel descris pentru ziua 0 se aplică pe aceeași zonă de testare (de unde se îndepărtează blana, dacă acest lucru este necesar), pe același șold, în ziua 6-8 și din nou în ziua 13-15.

1.5.2.3.2. Declanșare

Ziua 27-29 – grupul tratat și lotul martor

Se îndepărtează blana de pe șoldurile netratate ale animalelor tratate și ale animalelor martor. Un plasture oclusiv sau o capsulă care conține cantitatea adecvată din substanța testată, la concentrația maximă care nu provoacă nicio iritație, se aplică pe partea posterioară a șoldului netratat al animalelor din grupul tratat și din cel martor.

Dacă este necesar, se aplică și un plasture oclusiv sau o capsulă care nu conține decât vehiculul, pe partea anterioară a șoldului netratat al animalelor din ambele grupuri. Plasturele sau capsulele se vor menține în contact cu pielea timp de 6 de ore, cu ajutorul unui pansament potrivit.

1.5.2.3.3. Examinare și cotare

— la aproximativ 21 de ore după înlăturarea plasturelui, de pe zona de testare se îndepărtează blana;

— cu aproximativ 3 ore mai târziu (aproximativ 30 de ore după începutul aplicării dozei de declanșare), reacția cutanată este examinată și cotată pe baza scalei indicate în apendice;

— la aproximativ 24 de ore după această examinare (aproximativ 54 de ore după aplicarea dozei de declanșare), reacția cutanată este din nou examinată și cotată.

Se recomandă o citire oarbă a reacțiilor, atât în grupul tratat, precum și în lotul martor.

Dacă este necesară precizarea rezultatelor obținute cu ocazia primei expuneri de declanșare, o a doua expunere în vederea declanșării unei reacții, eventual cu un alt lot martor, poate fi avută în vedere, aproximativ cu o săptămână după prima expunere. Noua expunere în vederea declanșării unei reacții se poate efectua, de asemenea, pe primul lot martor.

▼B

Toate reacțiile cutanate și toate reacțiile neobișnuite, inclusiv reacțiile sistemice, ca urmare a unei expuneri de inducție sau de declanșare (de redeclanșare) trebuie înregistrate și cotate pe baza scalei Magnusson/Kligman (a se vedea apendicele). Alte tehnici, cum ar fi examinarea histopatologică sau măsurarea pliului cutanat, pot fi folosite la descrierea unor reacții îndoielnice.

2. **DATE (GMPT și testul Buehler)**

Rezultatele sunt sintetizate și incluse într-un tabel care va indica reacțiile cutanate la fiecare animal, pentru fiecare examinare.

3. **RAPORT (GMPT și testul Buehler)**

Dacă înainte de testul efectuat pe cobai s-a efectuat și un test de depistare [de exemplu, testul de umflare a urechilor la șoareci (MEST)], trebuie furnizate descrierile sau referințele acestora, precum și detaliile modului de operare și rezultatele obținute cu substanța testată și cu substanța de referință.

Raportul de testare (GMPT sau testul Buehler)

Raportul de testare va conține, în măsura posibilităților, următoarele informații:

Animale de experiență:

— specia/linia pură;

— numărul animalelor, vârsta, sexul;

— originea, condiții de adăpostire, regim alimentar etc.;

— greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

— tehnici de preparare a zonei de testare;

— detalii asupra materialelor folosite pentru aplicarea substanței și tehnica aplicării plasturelui;

— rezultatele testului-pilot și concluziile privind concentrațiile de inducție și de declanșare care trebuie utilizate în cadrul testului;

— detalii privind prepararea, aplicarea și eliminarea substanței testate;

— justificarea alegerii vehiculului;

— concentrații ale vehiculului și ale substanței testate utilizate pentru expunerile de inducție și de declanșare, cantitatea totală a substanței aplicate în vederea inducerii și a declanșării.

Rezultate:

— sintetizarea rezultatelor ultimului control de sensibilitate și de fiabilitate (a se vedea 1.3), inclusiv informații cu privire la substanță, la concentrația acesteia și la vehiculul utilizat;

▼B

— toate examinările efectuate pe fiecare animal, inclusiv cotările;

— descrierea naturii şi a gravității efectelor observate;

— toate examinările histopatologice.

Evaluarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 406 a OCDE.

▼B

Apendice

TABEL

Scala de cotare Magnusson/Kligman pentru evaluarea reacțiilor declanșate pe locul aplicării plasturilor

0 = niciun semn vizibil

1 = eritem discret sau neomogen

2 = eritem moderat și confluent

3 = eritem cu inflamație masivă

▼M4

B.7. STUDIU DE 28 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 407 (2008) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 407 a fost adoptată în 1981. În 1995 s-a adoptat o versiune revizuită, pentru a obține informații suplimentare de la animalele folosite în cadrul studiului, în special în ceea ce privește neurotoxicitatea și toxicitatea imunologică.

2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor privind testele și de elaborare a noilor orientări pentru depistarea și testarea unor factori perturbatori potențiali ai sistemului endocrin (8). Un element al activității a fost actualizarea orientării OCDE pentru „studiul de 28 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la rozătoare” (Orientarea 407) prin parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice testate. Această procedură a fost supusă unui amplu program internațional de testare a relevanței și fezabilității parametrilor suplimentari, performanțele acestor parametri pentru substanțe cu activitate (anti)estrogenică, (anti)androgenică și (anti)tiroidiană, reproductibilitatea intra- și interlaboratoare și interferența noilor parametri cu cei impuși de Orientarea 407 precedentă. Cantitatea mare de date obținute astfel a fost compilată și evaluată în detaliu într-un raport OCDE cuprinzător (9). Această metodă de testare actualizată B.7 (echivalentă cu Orientarea 407) este rezultatul experienței și rezultatelor obținute în cursul programului de testare internațional. Această metodă de testare permite plasarea unor efecte endocrine mediate în context cu alte efecte toxicologice.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

3. La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unei substanțe, determinarea toxicității orale folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale privind toxicitatea din teste de toxicitate acută. Această metodă de testare este destinată investigării efectelor asupra unei varietăți foarte largi de ținte potențiale ale toxicității. Studiul furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate ce pot fi antrenate de expunerea repetată pe o perioadă relativ limitată, inclusiv efecte asupra sistemului nervos, sistemului imunitar și celui endocrin. Referitor la aceste efecte particulare, studiul are în vedere identificarea substanțelor chimice cu potențial neurotoxic, care ar putea justifica investigarea mai aprofundată a acestui aspect și a substanțelor chimice care afectează fiziologia tiroidei. De asemenea, el poate furniza date privind substanțele care afectează organele reproductive ale masculilor și/sau femelelor la animalele adulte tinere și poate oferi o indicație privind efectele imunologice.

4. Rezultatele acestei metode de testare B.7 sunt folosite pentru identificarea pericolelor și evaluarea riscurilor. Rezultatele obținute din parametrii endocrini conecși sunt evaluate în contextul din „Cadrul conceptual OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine” (11). Metoda cuprinde studiul de bază de toxicitate la doză repetată, care se poate folosi pentru substanțe chimice pentru care nu este justificat un studiu de 90 de zile (de exemplu, în cazul în care volumul producției nu depășește anumite limite) sau ca preliminar pentru un studiu pe termen lung. Durata de expunere este de 28 de zile.

▼M4

5. Programul internațional desfășurat la validarea parametrilor corespunzători pentru posibila detectare a activității endocrine a unei substanțe chimice testate a arătat că experiența laboratorului de testare influențează mult calitatea datelor obținute prin această metodă de testare B.7. Acest lucru se referă în mod specific la determinarea histopatologică a modificărilor ciclice ale organelor reproductive ale femelelor și la determinarea greutății organelor mici dependente de hormoni, care sunt dificil de disecat. S-a elaborat un ghid privind examenul histopatologic (19). El este disponibil pe site-ul internet public al OCDE privind orientările pentru testare. Ghidul este conceput pentru a fi util medicilor patologi în examinările lor și contribuie la creșterea sensibilității testului. S-a constatat că o varietate de parametri indică toxicitatea pentru sistemul endocrin și aceștia au fost incluși în metoda de testare. Parametrii pentru care au fost disponibile date insuficiente pentru a demonstra utilitatea sau care au prezentat, în cadrul programului de validare, doar indicii slabe privind capacitatea lor de a contribui la detectarea perturbatorilor endocrini sunt propuși ca puncte finale opționale (a se vedea apendicele 2).

6. Pe baza datelor generate în cadrul procesului de validare, trebuie subliniat faptul că sensibilitatea acestui test nu este suficientă pentru identificarea tuturor substanțelor cu moduri de acțiune (anti)androgenice sau (anti)estrogenice (9). Metoda de testare nu se aplică într-o etapă de viață foarte sensibilă la perturbarea endocrină. Cu toate acestea, metoda de testare a identificat, în cursul procesului de validare, substanțe care afectează în mică sau mare măsură funcția tiroidei și substanțe cu acțiune endocrină puternică și moderată, care acționează prin intermediul receptorilor estrogenici sau androgenici dar, în majoritatea cazurilor, nu a reușit să identifice substanțele cu activitate endocrină care afectează ușor receptorii estrogenici sau androgenici. Astfel, metoda nu poate fi descrisă ca un test de screening pentru activitatea endocrină.

7. În consecință, lipsa efectelor legate de aceste moduri de acțiune nu se poate considera o dovadă a lipsei de efecte asupra sistemului endocrin. În ceea ce privește efectele endocrine mediate, caracterizarea substanței nu trebuie să se bazeze doar pe rezultatele acestei metode de testare, ci trebuie să fie folosite într-o abordare bazată pe forța probantă a datelor, integrând toate datele existente referitoare la o substanță chimică, pentru a caracteriza posibila activitate endocrină. Din acest motiv, luarea unei decizii de reglementare privind activitatea endocrină (caracterizarea substanței) trebuie să constituie o abordare cu bază largă, care nu se bazează doar pe rezultatele aplicării acestei metode de testare.

8. Se recunoaște faptul că toate procedurile bazate pe animale vor fi conforme cu standardele locale privind îngrijirea animalelor; descrierile referitoare la îngrijire și tratament prezentate mai jos reprezintă standarde de performanțe minime și vor fi înlocuite de regulamentele locale, dacă acestea sunt mai stricte. OCDE pune la dispoziție orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor (14).

9. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

10. Substanța chimică testată se administrează zilnic, pe cale orală, în doze graduale, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 28 de zile. Pe perioada administrării, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea detectării eventualelor semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în cursul testului se supun unei autopsii, iar la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate animalele care au supraviețuit. Un studiu de 28 de zile furnizează informații

▼M4

privind efectele expunerii. De asemenea, studiul poate furniza informații privind selectarea concentrațiilor pentru studiile pe termen mai lung. Datele obținute prin utilizarea metodei de testare permit caracterizarea toxicității substanței chimice testate, pentru indicarea relației doză-răspuns și determinarea nivelului la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL).

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

11. Testele se efectuează, de preferință, pe șobolani, dar pot fi utilizate și alte specii de rozătoare. În cazul în care parametrii specificați în cadrul acestei metode de testare B.7 sunt investigați pe alte specii de rozătoare, trebuie să se prezinte o justificare detaliată. Deși din punct de vedere biologic este plauzibil ca alte specii să răspundă la substanțele toxice într-o manieră similară cu șobolanul, utilizarea unor specii mai mici poate conduce la o variabilitate crescută din cauza dificultăților de disecție a unor organe mici. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea factorilor perturbatori ai sistemului endocrin, șobolanul a fost singura specie folosită. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. Administrarea începe cât mai curând posibil după înțărcare și, în orice caz, înainte de vârsta de nouă săptămâni. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite trebuie să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex. Atunci când se efectuează un studiu prin administrare orală repetată înaintea unui studiu mai lung, se recomandă folosirea animalelor din aceeași sușă și origine în ambele studii.

Adăpostire și hrănire

12. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de laborator se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C). Deși umiditatea relativă este de minimum 30 % și, de preferință, nu trebuie să depășească 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul, obiectivul este de 50-60 %. Iluminatul este artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate în cazul administrării prin această metodă. Animalele sunt adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu se va depăși numărul de cinci animale pe fiecare cușcă.

13. Hrana se analizează regulat în vederea identificării contaminanților. O probă din regimul alimentar se păstrează până la finalizarea raportului.

Pregătirea animalelor

14. Animale adulte, tinere, sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile trebuie să fie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Animalele sunt identificate individual și ținute în cuștile lor timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

Pregătirea dozelor

15. Substanța chimică testată se administrează prin gavaj sau prin regimul alimentar ori apa potabilă. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico/chimice/toxico-cinetice ale substanței chimice testate.

▼M4

16. Dacă este necesar, substanța testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. În cazul în care vehiculul utilizat nu este apa, trebuie să fie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale acestuia. Trebuie să se determine stabilitatea substanței chimice testate în vehicul.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

17. Se vor folosi minimum 10 animale (5 femele și 5 masculi) pentru fiecare doză. Dacă se prevede eutanasierea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total înainte de finalizarea studiului. În plus, se poate lua în considerare un grup satelit de 10 animale (5 din fiecare sex) în grupul martor și în grupul cu doza maximă, pentru observații vizând reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul a minimum 14 zile după tratament.

Dozare

18. Ca regulă generală, trebuie să existe cel puțin trei grupuri de testare și un grup martor, dar dacă din evaluarea altor date nu se anticipează niciun efect la administrarea repetată a unei doze de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, se poate realiza un test la valori-limită. Atunci când nu există date adecvate disponibile, se poate realiza un studiu de stabilire a intervalului (animale din aceeași sușă și sursă), pentru a contribui la determinarea dozelor de administrat. Exceptând tratamentul cu substanța chimică testată, animalele din grupul martor se tratează în mod identic cu animalele din grupul testat. Dacă pentru administrarea substanței chimice testate se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.

19. Nivelurile de dozare sunt selecționate ținându-se cont de toate datele disponibile privind toxicitatea și aspectele (toxico-)cinetice referitoare la substanța chimică testată sau la substanțele înrudite. Doza cea mai ridicată trebuie să fie aleasă astfel încât să producă efecte toxice care să nu ducă însă la moarte sau la suferințe intense. Se va alege mai apoi o serie de doze descrescătoare, pentru a se evidenția relația dintre răspuns și doza administrată și nivelul dozei la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și deseori este de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.

20. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra indicatoarelor de rezultat sensibile de tip imunitar, neurologic sau endocrin trebuie să fie interpretate cu precauție.

Testul la valori-limită

21. Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării prin regimul alimentar sau prin apa potabilă, la o concentrație echivalentă (în funcție de greutatea corporală) nu produce efecte toxice detectabile și atunci când nu se anticipează toxicitatea pe baza informațiilor despre substanțe cu structuri asemănătoare, poate să nu fie considerată necesară efectuarea unui studiu complet cu trei niveluri de dozare. Testul la valori-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

▼M4

Administrarea dozelor

22. Substanța chimică testată va fi administrată animalelor timp de 7 zile pe săptămână, pe o perioadă de 28 de zile. Când substanța chimică testată se administrează prin gavaj, ea se administrează animalelor în doză unică, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive care produc, de obicei, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului administrat trebuie să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.

23. În cazul administrării substanțelor chimice prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. Dacă substanța chimică testată se administrează prin intermediul regimului alimentar, există două alternative: fie sub forma unei concentrații constante în alimentație (ppm), fie sub forma unei doze constante în raport cu greutatea corporală a animalului; trebuie să se specifice alternativa folosită. Atunci când substanța chimică se administrează prin gavaj, administrarea dozei trebuie să se facă zilnic aproximativ la aceeași oră și să fie ajustată după în funcție de necesități, pentru a menține un nivel constant al dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când se efectuează un studiu cu doză repetată înainte de un studiu pe lungă durată, regimul alimentar trebuie să fie similar în ambele cazuri.

Observații

24. Perioada de observație durează 28 de zile. Animalele dintr-un grup satelit, prevăzut pentru examinări suplimentare, sunt ținute sub observație, fără tratament, timp de cel puțin încă 14 zile, astfel încât să se poată detecta eventualele apariții întârziate ale efectelor toxice, persistența lor sau recuperarea de pe urma efectelor toxice.

25. Observațiile clinice generale sunt efectuate cel puțin o dată pe zi, de preferință în același moment (sau aceleași momente) ale zilei, în funcție de perioada de după încheierea administrării în care efectele sunt mai pronunțate. Se consemnează starea de sănătate a animalelor. Toate animalele sunt examinate cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.

26. Toate animalele sunt supuse unei observații clinice detaliate înaintea primei expuneri (astfel încât mai târziu să se poată facă comparații între diferitele stări de sănătate la același individ) și cel puțin o dată pe săptămână în perioada următoare. Aceste examinări sunt efectuate în afara cuștii în care sunt găzduite animalele, într-o incintă standard și, de preferință, de fiecare dată în același moment al zilei. Ele se consemnează cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Variabilitatea condițiilor de laborator este redusă la minim, iar examinările se fac, de preferință, de către persoane care nu sunt informate asupra tratamentului. Examinările vor avea în vedere, între altele, modificări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, secrețiilor și excrețiilor, precum și activitatea autonomă (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilelor, respirație neobișnuită). Sunt consemnate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și răspuns la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi) (2).

27. În cursul celei de-a patra săptămâni de expunere, se evaluează răspunsul la diferiți stimuli (2) (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (3) (4) (5), forța de prehensiune (6) și activitatea locomotoare (7). Detalii suplimentare referitoare la procedurile utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Se pot folosi însă și alte proceduri decât cele din referințele bibliografice.

▼M4

28. Observațiile funcționale din a patra săptămână de expunere pot fi omise dacă studiul este efectuat înaintea unui studiu subcronic (de 90 de zile). În acest caz, observațiile funcționale trebuie să facă parte din studiul complementar. În schimb, dacă există informații pe baza unor observații funcționale efectuate în cadrul unor studii anterioare prin administrare repetată, acest lucru poate facilita alegerea dozelor la studiul subcronic ulterior.

29. În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupurile care prezintă simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar interfera semnificativ cu desfășurarea testului funcțional.

30. La autopsie se poate determina (opțional) ciclul estral al tuturor femelelor, prin prelevarea de frotiuri vaginale. Aceste observații vor furniza informații privind stadiul ciclului estral la momentul sacrificiului și vor fi utile la evaluarea histologică a țesuturilor sensibile la estrogen [a se vedea ghidul privind examenul histopatologic (19)].

Greutatea corporală și consumul de hrană și apă

31. Toate animalele trebuie să fie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa potabilă, se măsoară cel puțin săptămânal și consumul de apă.

Examenul hematologic

32. Următoarele examinări hematologice trebuie să fie efectuate la sfârșitul perioadei de testare: hematocritul, concentrațiile de hemoglobină, numărul de eritrocite, reticulocitele, numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare. Printre alte determinări efectuate în cazul în care substanța chimică testată sau eventualii săi metaboliți au sau se presupune că au proprietăți oxidante se numără concentrația de methemoglobină și corpii Heinz.

33. Probele de sânge trebuie să fie prelevate într-un punct determinat, chiar înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în timpul acesteia și se conservă în condiții adecvate. Animalele nu primesc hrană în noaptea dinainte de eutanasiere ([1]).

Biochimia clinică

34. Trebuie să se efectueze măsurări biochimice clinice în vederea cercetării principalelor efecte toxice asupra țesuturilor, în special asupra ficatului și asupra rinichilor, pe baza unor probe de sânge prelevate de la toate animalele chiar înainte sau în timpul procedurii de eutanasiere (cu excepția animalelor muribunde sau eutanasiate înainte de încheierea studiului). Determinările efectuate în plasmă sau ser vor include nivelurile de sodiu, potasiu, glucoză, colesterol total, uree, creatinină, proteine totale și albumină, nivelurile a cel puțin două enzime care indică efectele hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gama glutamil transpeptidaza și sorbitol dehidrogenaza), precum și acizii biliari. În unele cazuri, determinările altor enzime (de origine hepatică sau diferită) și a bilirubinei pot furniza informații utile.

35. Opțional, în cursul ultimei săptămâni a studiului se pot efectua următoarele analize de urină, cu colectarea într-un interval de timp a unui volum de urină: aspect, volum, osmolalitate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

([1]) Pentru o serie de măsurători în ser și plasmă, în special pentru glucoză, se recomandă absența hranei peste noapte. Motivul principal pentru această preferință este că variabilitatea crescută care ar rezulta inevitabil în cazul administrării hranei peste noapte ar putea masca efecte mai subtile și ar face interpretarea mai dificilă. În schimb, privarea de hrană în timpul nopții poate afecta metabolismul general al animalelor și, în special în studiile privind hrănirea, poate să perturbe expunerea zilnică la substanța chimică testată. În cazul în care probele sunt prelevate după o perioadă de privare de hrană, determinările biochimice trebuie să fie efectuate după examinările funcționale din săptămâna a patra a studiului.

▼M4

36. În plus, trebuie avute în vedere studii pentru investigarea indicatorilor plasmatici sau serici ai leziunilor generale ale țesuturilor. Alte determinări care ar putea fi necesare în cazul în care proprietățile substanței chimice testate pot sau sunt susceptibile să modifice profilurile metabolice, includ calciul, fosfații, trigliceridele, hormonii specifici și colinesteraza. Acestea trebuie să fie identificate pentru substanțele chimice din anumite clase sau de la caz la caz.

37. Deși în cadrul evaluării internaționale a efectelor endocrine conexe nu s-a putut demonstra un avantaj clar pentru determinarea hormonilor tiroidieni (T3, T4) și TSH, poate fi necesar să se păstreze probe de plasmă sau ser pentru măsurarea T3, T4 și TSH (opțional) în cazul în care există o indicație a unui efect asupra axei hipofiză-tiroidă. Aceste probe pot fi congelate la –20 °C pentru păstrare. Următorii factori pot influența variabilitatea și concentrațiile absolute la determinarea hormonale:

— momentul eutanasierii, din cauza variației diurne a concentrațiilor hormonale;

— metoda de eutanasiere pentru a evita stresul excesiv al animalelor, care poate afecta concentrațiile hormonale;

— seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot diferi prin curbele standard.

Identificarea definitivă a substanței cu activitate asupra tiroidei este mai credibilă pe baza analizei histopatologice decât pe baza determinării nivelurilor hormonale.

38. Probele de plasmă destinate în mod specific determinării hormonale trebuie să fie prelevate la momente comparabile din zi. Se recomandă să se ia în considerare determinarea valorilor T3, T4 și TSH inițiate pe baza modificărilor în histopatologia tiroidei. Valorile numerice obținute la analiza concentrațiilor hormonale diferă în funcție de diferitele seturi de testare comerciale. În consecință, se poate ca furnizarea criteriilor de performanță să nu fie posibilă pe baza unor date istorice uniforme. Ca alternativă, laboratoarele trebuie să încerce menținerea coeficienților de control al variației sub 25 pentru T3 și T4 și sub 35 pentru TSH. Toate concentrațiile se consemnează în ng/ml.

39. Dacă informațiile de bază colectate anterior nu sunt adecvate, trebuie luată în considerare determinarea parametrilor hematologici și biochimici înaintea începerii administrării sau, de preferință, pe un grup de animale neincluse în grupurile experimentale.

PATOLOGIA

Autopsia

40. Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. *Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, prostata + veziculele seminale și glandele coagulante în ansamblu, timusul, splina, creierul și inima* tuturor animalelor (cu excepția celor muribunde și/sau a celor eutanasiate înaintea încheierii studiului) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite în stare proaspătă după disecție, pentru a evita deshidratarea. Se procedează cu atenție la curățarea ansamblului prostatei, pentru a evita perforarea veziculelor seminale care conțin fluid. Ca alternativă, veziculele seminale și prostata pot fi curățate și cântărite după fixare.

▼M4

41. În plus, opțional se pot cântări alte două țesuturi, cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea: perechea de ovare (greutate în stare umedă) și uterul, inclusiv colul uterin [îndrumări privind îndepărtarea și prepararea țesuturilor uterine pentru determinarea greutății sunt puse la dispoziție în Orientarea 440 a OCDE (18)].

42. După fixare se poate determina (opțional) greutatea tiroidei. Curățarea se face foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor poate compromite analiza histopatologică.

43. Țesuturile următoare trebuie să fie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut (a se vedea punctul 47): *toate țesuturile care prezintă leziuni macroscopice, encefalul* (regiuni reprezentative: creierul mare, cerebelul și puntea), *măduva spinării, ochiul, stomacul, intestinul subțire, intestinul gros* (inclusiv plăcile Peyer), *ficatul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, timusul, tiroida, traheea și plămânii* (conservați prin umflare cu fixativ și imersie ulterioară), *gonadele* (testiculele și ovarele), *organele genitale anexe* (de exemplu, uterul și colul, epididimul, prostata + veziculele seminale cu glandele coagulante), *vaginul, vezica urinară, ganglionii limfatici* [în afară de cel mai apropiat ganglion de drenare, se prelevează încă un ganglion limfatic, conform experienței laboratorului (15)], *nervul periferic* (sciatic sau tibial), de preferință foarte aproape de mușchi, *mușchi scheletic și os cu măduvă osoasă* (secțiune sau, ca alternativă, aspirat de măduvă osoasă proaspăt fixat pe lamă). Se recomandă fixarea testiculelor prin imersie în fixator Bouin sau Davidson modificat (16) (17). Tunica albuginea trebuie perforată cu un ac, cu atenție și la adâncime mică, la ambii poli ai organului, pentru a permite penetrarea rapidă a fixatorului. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate organe-țintă probabile pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

44. Următoarele țesuturi pot furniza indicații valoroase privind efectele asupra sistemului endocrin: gonadele (ovarele și testiculele), organele sexuale anexe (uterul, inclusiv colul uterin, epididimul, veziculele seminale cu glandele coagulante, prostata dorso-laterală și ventrală), vaginul, hipofiza, glanda mamară masculină, tiroida și glanda suprarenală. Modificările glandelor mamare masculine nu au fost suficient documentate dar acest parametru poate fi foarte sensibil la substanțe cu acțiune estrogenică. Observarea organelor/țesuturilor neenumerate la punctul 43 este opțională (a se vedea apendicele 2).

45. Ghidul privind examenul histopatologic (19) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și examenul histopatologic al țesuturilor endocrine.

46. În programul internațional de testare s-au obținut dovezi în sensul că se pot identifica efecte endocrine subtile ale unor substanțe cu capacitate redusă de afectare a homeostaziei hormonale, prin perturbarea sincronizării ciclului estral în diferite țesuturi și mai puțin prin alterări histopatologice clare ale organelor sexuale feminine. Deși nu s-a obținut vreo dovadă concludentă privind asemenea efecte, se recomandă să se ia în considerare dovezile unor posibile desincronizări ale ciclului estral la interpretarea examenului histopatologic al ovarelor (celule foliculare, tecale și granulare), uterului, colului uterin și vaginului. În cazul în care este evaluat, stadiul ciclului determinat prin frotiuri vaginale poate fi inclus de asemenea în această comparație.

▼M4

Examenul histopatologic

47. Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor conservate ale tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene sunt extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

48. Se examinează toate leziunile macroscopice.

49. Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

DATE ȘI RAPORT

Date

50. Rezultatele sunt indicate pentru fiecare animal în parte. În plus, toate datele sunt rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de testare numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau eutanasiate din motive umane și momentul morții sau al eutanasierii, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate observate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor care prezintă fiecare tip de leziune.

51. Dacă este posibil, rezultatele numerice se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Pentru comparațiile efectelor pe un interval de dozare se evită recurgerea la teste t multiple. Metodele statistice se aleg în faza de concepere a studiului.

52. Pentru controlul calității, se propune colectarea datelor martor anterioare și calculul coeficienților de variație pentru datele numerice, în special pentru parametrii în legătură cu detectarea unui factor perturbator al proceselor endocrine. Aceste date se pot folosi în scop comparativ la evaluarea studiilor curente.

Raportul de testare

53. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța chimică testată:

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare.

Vehiculul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului, dacă este altul decât apa.

Animalele testate:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.

— greutatea fiecărui animal la începutului testului.

— justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât șobolanul.

Condițiile de testare:

— justificarea alegerii nivelului dozei administrate;

— detalii privind formula substanței chimice testate/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

▼**M4**

— detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice testate;

— conversia concentrației substanței chimice testate (ppm) în hrană/apa potabilă la doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

Efecte opționale investigate

— lista efectelor opționale investigate.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și niveluri ale dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;

— natura, gravitatea și durata semnelor clinice (reversibile sau nu);

— evaluările activității senzoriale, a forței de prehensiune și a activității locomotorii;

— examenele hematologice și valorile de referință corespunzătoare;

— examenele de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;

— greutatea corporală în momentul eutanasierii animalului și date privind greutatea organelor;

— concluziile autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;

— date referitoare la absorbție, dacă este cazul;

— tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul.

Evaluarea rezultatelor

Concluzii

▼M4

Apendicele 1

DEFINIȚII

Androgenicitatea este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiandrogenicitatea este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiestrogenicitatea este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Activitatea antitiroidiană este capacitatea unei substanțe de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Dozarea este un termen general care desemnează doza administrată, frecvența și durata administrării.

Doza este cantitatea de substanță chimică testată administrată. Doza este exprimată ca greutatea substanței chimice testate pe unitatea de greutate a animalului testat (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

Toxicitatea evidentă este un termen general care descrie simptome clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice testate. Aceste manifestări trebuie să fie suficient de pronunțate pentru a permite o evaluare a riscurilor și să se poată anticipa că o mărire a dozei administrate poate declanșa apariția unor simptome de toxicitate severe și probabil moartea.

NOAEL este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai înalt nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse în legătură cu tratamentul.

Estrogenicitatea este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Substanță chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

Activitatea tiroidiană este capacitatea unei substanțe de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Validarea este un proces științific conceput pentru caracterizarea cerințelor operaționale și limitărilor unei metode de testare și pentru demonstrarea credibilității sale și relevanței pentru un anumit scop.

▼M4

Apendicele 2

Indicatori de rezultat recomandați pentru detectarea perturbatorilor endocrini (EDs) în această metodă de testare B.7

Indicatori de rezultat obligatorii	Indicatori de rezultat opționali
Greutate	
— Testicule — Epididim — Glande suprarenale — Prostată + veziculele seminale cu glandele coagulante	— Ovare — Uter, inclusiv colul uterin — Tiroidă
Examen histopatologic	
— Gonade: — testicule; și — ovare — Organe sexuale anexe: — epididim; — prostată + veziculele seminale cu glandele coagulante; — uter, inclusiv colul uterin — Glande suprarenale — Tiroidă — Vagin	— Frotiuri vaginale — Glande mamare masculine — Hipofiză
Determinări hormonale	
	— Nivelurile circulatorii ale T3, T4 — Nivelurile circulatorii ale TSH

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (Paris, 1992), Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998), Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD (2006), Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002), Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012), Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html.

(12) OECD (2006), Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD, Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000), Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D., Walter G. (2005), STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess R.A., Moore B.J. (1993), Histological Methods for the Evaluation of the Testis. În: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin R.E. and Heindel J.J. (eds.), Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse J.R., Warbrittion A.R, Jonassen H., Creasy D.M. (2002), Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007), OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009), Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 28 DE ZILE

REZUMAT

Această metodă de testare revizuită B.8 a fost concepută pentru caracterizarea completă a toxicității substanței chimice testate prin calea de inhalare în urma expunerii repetate pe o perioadă limitată (28 de zile) și pentru a furniza date pentru evaluările cantitative ale riscului prin inhalare. Grupuri de minim 5 masculi și 5 femele de rozătoare sunt expuse 6 ore pe zi timp de 28 zile la a) substanța chimică testată la trei sau mai multe niveluri de concentrație; b) aer filtrat (grup martor negativ); și/sau c) vehicul (grup martor vehicul). În general, animalele sunt expuse 5 zile pe săptămână, dar este permisă și expunerea timp de 7 zile pe săptămână. Masculii și femelele se testează întotdeauna, dar pot fi supuși unor niveluri de concentrație diferite dacă se cunoaște faptul că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată. Această metodă permite conducătorului studiului flexibilitatea de a include grupuri satelit (de reversibilitate), lavajul bronhoalveolar (BAL), teste neurologice și evaluări suplimentare clinice patologice și histopatologice, pentru caracterizarea mai bună a toxicității unei substanțe chimice testate.

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 412 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 412 privind inhalarea subacută a fost adoptată în 1981 (1). Această metodă de testare B.8 (ca echivalent la varianta revizuită a Orientării 412) a fost actualizată pentru a reflecta nivelul științific și pentru a satisface cerințele de reglementare curente și viitoare.

2. Această metodă permite caracterizarea efectelor adverse în urma expunerii repetate zilnice prin inhalarea substanței chimice testate timp de 28 de zile. Datele obținute din studiile de 28 de zile de toxicitate subacută se pot folosi pentru evaluări cantitative ale riscului [în cazul în care studiul nu este urmat de un studiu de 90 de zile de toxicitate subcronică prin inhalare (capitolul B.29 din prezenta anexă)]. De asemenea, datele pot furniza informații privind selectarea concentrațiilor pentru studiile pe termen mai lung, de exemplu un studiu de 90 de zile de toxicitate subcronică prin inhalare. Această metodă nu este destinată în mod specific testării nanomaterialelor. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul 39 (2).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

3. Toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată trebuie luate în considerare de laboratorul de testare înainte de efectuarea studiului, în vederea îmbunătățirii calității studiului și minimizării utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate concentrații de testare corespunzătoare includ: identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate; rezultatele tuturor testelor de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; și date rezultate din testarea toxicității acute prin inhalare. În cazul în care în decursul studiului se anticipează sau se observă neurotoxicitatea, conducătorul studiului poate alege să includă și evaluări adecvate, de exemplu un set de observații funcționale (FOB) și măsurarea activității motorii. Deși momentele expunerii în funcție de examinările specifice pot fi critice, desfășurarea acestor activități suplimentare nu trebuie să afecteze protocolul studiului de bază.

▼M4

4. Diluțiile substanțelor corozive sau iritante testate se pot testa la concentrații care generează gradul dorit de toxicitate [a se vedea Ghidul 39 (2)]. La expunerea animalelor la aceste materiale, concentrațiile vizate trebuie să fie suficient de reduse pentru a nu induce durere sau suferință accentuată, dar totuși suficiente pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt selectate de la caz la caz, de preferință pe baza unui studiu de stabilire a dozelor conceput corespunzător, care furnizează informații privind efectul critic, pragul de iritare și momentul apariției (a se vedea punctele 11-13). Se prezintă justificarea pentru selecția concentrației.

5. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită trebuie să fie eutanasiate. Animalele muribunde sunt considerate în același mod ca animalele care mor în cursul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau expuse unor suferințe intense și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unui ghid separat OCDE privind efectele asupra omului (3).

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

6. Se utilizează rozătoare adulte, tinere, sănătoase, provenite din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul. Dacă se utilizează alte specii, decizia trebuie să fie motivată.

Pregătirea animalelor

7. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua randomizării, animalele trebuie să fie adulți tineri în vârstă de 7 până la 9 săptămâni. Greutățile corporale trebuie să se încadreze în intervalul de ± 20 % față de greutatea medie pentru fiecare sex. Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cel puțin 5 zile înainte de începerea administrării dozelor, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

Îngrijirea animalelor

8. Dacă este posibil, animalele sunt identificate individual, cu transpondere subcutanate, pentru a facilita observarea și a evita confuziile. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă este menținută, în mod ideal, în intervalul de 30 până la 70 %, deși, acest lucru poate să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri animalele sunt închise în cuști în grupuri, în funcție de sex și concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele sunt expuse doar în zona nasului, ar putea fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau de imobilizare. Imobilizarea poate afecta efecte fiziologice cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator pe minut. În cazul în care sunt disponibile date generice care demonstrează că nu se produc asemenea modificări într-o măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea preliminară la tuburile de imobilizare. Animalele la care întregul corp este expus corp unui aerosol sunt ținute în cuști individuale în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare de laborator, convenționale și certificate, cu excepția perioadei de expunere, iar apa de băut din rețeaua municipală este furnizată în cantitate nelimitată. Iluminatul este artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

▼M4

Incintele de inhalare

9. Natura substanței chimice testate și obiectivul testului sunt luate în considerare la selectarea unei incinte de inhalare. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). În general, expunerea doar în zona nasului este preferată pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere prin intermediul întregului corp, dar această metodă trebuie să fie justificată în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, „volumul" total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor particulare sunt descrise în Ghidul 39 (2).

STUDII DE TOXICITATE

Concentrații-limită

10. Spre deosebire de studiile de toxicitate acută, în studiile de 28 de zile de toxicitate subacută prin inhalare nu se definesc limite de concentrație. Concentrația testată maximă trebuie să țină seama de: 1. concentrația maximă realizabilă; 2. nivelul de expunere umană în „cele mai nefavorabile condiții"; 3. necesitatea de a menține un aport adecvat de oxigen; și/sau 4. considerații privind bunăstarea animalelor. În absența unor limite bazate pe date, se pot utiliza limitele acute din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (13) (până la o concentrație maximă de 5 mg/l pentru aerosoli, 20 mg/l pentru vapori și 20 000 ppm pentru gaze); a se vedea Ghidul 39 (2). În cazul în care este necesară depășirea acestor limite la testarea gazelor sau substanțelor de testare foarte volatile (de exemplu, agenți frigorifici), trebuie să se prezinte justificarea. Concentrația-limită trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce un stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

Studiul de stabilire a intervalului

11. Înainte de a începe studiul principal, poate fi necesar să se efectueze un studiu de stabilire a intervalului. Un astfel de studiu este mai cuprinzător decât un studiu de observare, deoarece nu se limitează la alegerea concentrației. Cunoștințele dobândite în urma unui studiu de stabilire a intervalului pot conduce la un studiu principal reușit. Un studiu de stabilire a intervalului poate, de exemplu, să furnizeze informații tehnice privind metodele analitice, granulometria, descoperirea mecanismelor toxice, date de patologie clinică și histopatologice și estimări asupra posibilelor concentrații NOAEL și MTC în studiul principal. Conducătorul studiului poate alege să folosească studiul de stabilire a intervalului pentru identificarea pragului de iritație a căilor respiratorii (de exemplu, cu examenul histopatologic al căilor respiratorii, testarea funcției pulmonare sau lavaj bronhoalveolar), a concentrației superioare care este tolerată fără stres excesiv pentru animale și a parametrilor care vor caracteriza cel mai bine toxicitatea unei substanțe chimice testate.

12. Un studiu de stabilire a intervalului poate consta în unul sau mai multe niveluri de concentrație. Nu se vor expune mai mult de trei masculi și trei femele la fiecare nivel de concentrație. Un studiu de stabilire a intervalului durează minimum 5 zile și, în general, nu mai mult de 14 zile. Justificarea alegerii concentrațiilor pentru studiul principal trebuie să fie specificată în raportul de studiu. Obiectivul studiului principal este să demonstreze relația concentrație-răspuns pe baza efectului anticipat ca fiind cel mai sensibil. În mod ideal, concentrația inferioară este o concentrație fără efect advers observabil, iar concentrația superioară trebuie să determine toxicitatea neechivocă fără a induce stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

▼M4

13. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de stabilire a intervalului, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv relațiile structură-activitate și date pentru substanțe chimice similare (a se vedea punctul 3). Un studiu de stabilire a intervalului poate confirma/infirma efectele considerate a fi cele mai sensibile din punct de vedere al mecanismului, de exemplu inhibarea colinesterazei de către fosfați organici, formarea methemoglobinei de către agenți toxici pentru eritrocite, hormonii tiroidieni (T_3, T4) pentru agenții toxici față de tiroidă, proteinele, LDH sau neutrofilele în lavajul bronhoalveolar pentru particule puțin solubile nedăunătoare sau aerosoli iritanți pentru plămâni.

Studiul principal

14. Studiul principal de toxicitate subacută constă, în general, în trei niveluri de concentrație și grupuri martor negative (cu aer) și/sau cu vehicul studiate în paralel, după cum este necesar (a se vedea punctul 17). Trebuie să se utilizeze toate datele disponibile, pentru a contribui la selectarea nivelurilor de expunere adecvate, inclusiv rezultatele studiilor de toxicitate sistemică, metabolism și cinetică (trebuie să se acorde o atenție specială evitării nivelurilor ridicate de concentrație care saturează procesele cinetice). Fiecare grup testat conține cel puțin 10 rozătoare (5 masculi și 5 femele) expuse la substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 5 zile pe săptămână, pe o perioadă de 4 săptămâni (durata totală a studiului de 28 de zile). Animalele pot fi expuse și 7 zile pe săptămână (de exemplu, la testarea produselor farmaceutice inhalate). În cazul în care se știe că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată, sexele pot fi expuse la niveluri diferite de concentrație, pentru optimizarea răspunsului la concentrație, așa cum se arată la punctul 15. Dacă alte specii de rozătoare sunt expuse doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. Trebuie să se prezinte o justificare la utilizarea unei durate de expunere sub 6 ore/zi sau în cazul în care este necesar un studiu de lungă durată (de exemplu 22 de ore/zi) cu expunerea întregului corp [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Alimentarea se sistează în perioada expunerii, în afară de cazul în care expunerea depășește 6 ore. La expunerea prin intermediul întregului corp se poate asigura apa.

15. Concentrațiile-țintă selectate identifică organele-țintă și demonstrează o relație clară concentrație-răspuns:

— nivelul de concentrație ridicat trebuie să inducă efecte toxice dar să nu determine simptome persistente sau mortalitate, ceea ce ar preveni o evaluare semnificativă;

— nivelurile de concentrație intermediare sunt administrate eșalonat, astfel încât efectele toxice să fie graduale între concentrația redusă și cea ridicată;

— nivelul de concentrație redusă trebuie să producă o toxicitate redusă sau să nu producă semne de toxicitate.

Studiul satelit (de reversibilitate)

16. Un studiu satelit (de reversibilitate) se poate folosi pentru a observa reversibilitatea, persistența sau apariția cu întârziere a toxicității pentru o perioadă post-tratament de lungime adecvată, dar nu mai mare de 14 zile. Grupurile satelit (de reversibilitate) constau în cinci masculi și cinci femele expuse în paralel cu animalele experimentale din studiul principal. Grupurile din studiile satelit (de reversibilitate) sunt expuse la substanța chimică testată la nivelul maxim de concentrație și trebuie să existe grupuri martor cu aer și/sau vehicul, după caz, studiate în paralel (a se vedea punctul 17).

▼M4

Animalele din grupul martor

17. Animalele din grupul martor negativ (cu aer) studiat în paralel se manipulează într-o manieră identică cu cele din grupul de testare, cu excepția faptului că sunt expuse la aer filtrat în locul substanței chimice testate. În cazul în care se folosește apa sau altă substanță pentru generarea atmosferei de testare, se include în studiu un grup martor pentru vehicul, în locul grupului martor negativ (cu aer). Când este posibil, se folosește apa ca vehicul. Când se folosește apa ca vehicul, animalele din grupul martor se expun la aer cu aceeași umiditate relativă ca și grupurile expuse. Alegerea unui vehicul adecvat se bazează pe un studiu preliminar corespunzător sau pe date anterioare. În cazul în care nu se cunoaște bine toxicitatea unui vehicul, conducătorul studiului poate alege să folosească atât un grup martor negativ (cu aer) cât și un grup martor pentru vehicul, dar se recomandă categoric evitarea acestei abordări. În cazul în care datele anterioare arată că vehiculul nu este toxic, nu este necesar un grup martor negativ (cu aer) și se folosește doar un grup martor pentru vehicul. În cazul în care un studiu preliminar al unei substanțe chimice testate formulate într-un vehicul nu prezintă nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată și se va utiliza acest grup martor pentru vehicul.

CONDIȚII DE EXPUNERE

Administrarea concentrațiilor

18. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația aleasă și/sau forma fizică cu cea mai probabilitate de prezență în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele higroscopice și reactive din punct de vedere chimic sunt testate în condiții de aer uscat. Trebuie să se acorde atenție pentru a evita generarea concentrațiilor explozive. Materialele sub formă de particule pot fi supuse unor procese mecanice pentru reducerea dimensiunii particulelor. Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).

Distribuția granulometrică

19. Granulometria se efectuează pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) de la 1 la 3 μm, cu o abatere standard geometrică (σ_g) în intervalul 1,5-3,0 (4). Trebuie depus un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, dar în cazul în care acest lucru nu este realizabil, trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele de vapori metalici pot fi mai mici decât acest standard iar particulele cu sarcină electrică și fibrele pot fi mai mari.

Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul

20. În mod ideal, substanța chimică testată se testează fără vehicul. În cazul în care este necesar să se folosească un vehicul pentru a genera o concentrație și o granulometrie corespunzătoare pentru substanța chimică testată, se preferă apa. Întotdeauna când o substanță chimică testată este dizolvată într-un vehicul, trebuie să se demonstreze stabilitatea sa.

MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE

Debitul de aer în incintă

21. Debitul de aer vehiculat prin incinta de expunere este controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea în timp real a concentrației (sau stabilității în timp a) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc de control indirect al parametrilor dinamici relevanți pentru inhalare. În cazul în care concentrația este monitorizată în

▼M4

timp real, frecvența măsurătorii debitelor de aer se poate reduce la o singură măsurătoare pe zi pentru fiecare expunere. Trebuie să se acorde o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte pentru expunere doar în zona nasului. Concentrația de oxigen este de minimum 19 % iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se poate atinge acest standard, se măsoară concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon. În cazul în care măsurătorile în prima zi de expunere arată că aceste gaze se află la niveluri corespunzătoare, nu mai sunt necesare alte măsurători.

Temperatura și umiditatea relativă în incintă

22. Temperatura incintei trebuie să fie menținută la 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor, pentru expunerea în zona nasului și a întregului corp, trebuie să fie monitorizată și înregistrată orar în timpul fiecărei expuneri, dacă este posibil. Este preferabil ca umiditatea relativă să fie menținută în intervalul de 30 până la 70 %, dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

Substanța chimică testată: concentrația nominală

23. Când este posibil, se calculează și se consemnează concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală reprezintă masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este utilizată pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

Substanța chimică testată: concentrația efectivă

24. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie să fie susținută printr-un studiu preliminar privind caracterizările specifice ale substanței chimice testate. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponent se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în acest caz sunt necesare date analitice care demonstrează caracterul similar al compoziției materialului antrenat de aer și al materialului inițial. În cazul în care aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară reanalizarea la intervale regulate a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa de suspensie în aer). Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă.

25. Se folosește un lot de substanță chimică testată pe întreaga durată a studiului, dacă este posibil, iar proba testată trebuie să fie păstrată în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței chimice testate, care să includă puritatea sa și, dacă este fezabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără să se limiteze la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară determinată prin analize de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei testate nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu culoare, natura fizică etc.).

▼M4

26. Atmosfera de expunere trebuie să se mențină cât mai constantă posibil. Pentru a demonstra stabilitatea condițiilor de expunere se poate utiliza un dispozitiv de monitorizare în timp real, de exemplu un fotometru pentru aerosoli sau un analizor de carbon total pentru vapori. Concentrația efectivă în incintă se măsoară ce puțin de 3 ori în timpul fiecărei zile de expunere, pentru fiecare nivel de expunere. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. În mod ideal, această probă se colectează apoi pe întreaga perioadă de expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu trebuie să se abată de la concentrația medie cu mai mult de ± 10 % pentru gaze și vapori sau ± 20 % pentru aerosoli cu lichide sau solide. Trebuie să se calculeze și să se înregistreze timpul necesar pentru echilibrarea incintei (t_{95}). Durata unei expuneri acoperă timpul în care se generează substanța chimică testată. Aceasta ia în considerare perioadele necesare pentru atingerea echilibrului în incintă (t_{95}) și pentru descompunere. Îndrumări pentru estimarea t_{95} pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

27. Pentru amestecuri foarte complexe formate din gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), fiecare fază se poate comporta diferit într-o incintă de inhalare. Prin urmare, se selectează cel puțin o substanță indicatoare (analit), de obicei substanța activă principală din amestec, din fiecare fază (gaz/vapori și aerosol). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, trebuie să se raporteze concentrația analitică pentru amestecul total și nu doar pentru ingredientul activ sau substanța indicatoare (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

Substanța chimică testată: distribuția granulometrică

28. Granulometria aerosolilor se face cel puțin o dată pe săptămână pentru fiecare nivel de concentrație, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de granulometrie (APS). În cazul în care se obține o echivalență a rezultatelor obținute cu impactorul în cascadă și cu un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu.

29. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/barbotor de gaze în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometrică trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența tuturor concentrațiilor în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, trebuie să se ia măsuri pentru a minimiza datele neconcludente care pot duce la necesitatea de repetare a unui studiu.

30. Se efectuează granulometria pentru vapori atunci când există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau în cazul în care se detectează particule într-o atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte.

OBSERVAȚII

31. Animalele trebuie să fie observate clinic înainte, în timpul și după perioada de expunere. Poate fi indicată observarea mai frecventă, în funcție de răspunsul animalelor în timpul expunerii. În cazul în care observarea animalelor este împiedicată de utilizarea tuburilor de imobilizare, a incintelor slab iluminate pentru expunerea întregului corp sau a atmosferelor opace, animalele se observă cu atenție după expunere. Prin observarea înainte de expunerea din ziua următoare se poate evalua reversibilitatea sau exacerbarea efectelor toxice.

▼M4

32. Toate observațiile trebuie să fie consemnate în evidențele individuale pentru fiecare animal. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

33. Observarea animalelor în cușcă urmărește modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor; modificarea sistemului respirator și circulator, modificările sistemului nervos și modificări în activitatea somato-motorie și în modelele comportamentale. Se va acorda o atenție specială observării tremorului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi de bradipnee reflexă sau hipo/hipertermie asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate. În protocolul studiului se pot include evaluări suplimentare, de exemplu cinetica, biomonitorizarea, funcționarea plămânilor, retenția unor materiale puțin solubile care se acumulează în țesutul pulmonar și modificările comportamentale.

GREUTATEA CORPORALĂ

34. Greutățile individuale ale animalelor se consemnează cu puțin înaintea primei expuneri (ziua 0), apoi de două ori pe săptămână (de exemplu: vineri și luni, pentru a evidenția recuperarea după un weekend fără expunere sau la un interval de timp pentru a permite evaluarea toxicității sistemice), precum și la momentul morții sau eutanasierii. În cazul în care nu există efecte în primele 2 săptămâni, greutățile corporale se pot măsura săptămânal pe restul duratei studiului. Animalele din grupuri satelit (de reversibilitate) (în cazul în care sunt folosite) se cântăresc în continuare săptămânal pe întreaga perioadă de recuperare. La încheierea studiului, toate animalele sunt cântărite cu puțin înainte de sacrificare, pentru a permite calcularea corectă a rapoartelor între greutatea organelor și cea corporală.

CONSUMUL DE HRANĂ ȘI APĂ

35. Consumul de hrană se măsoară săptămânal. Se poate măsura și consumul de apă.

PATOLOGIA CLINICĂ

36. Evaluările de patologie clinică se efectuează pentru toate animalele, inclusiv pentru animalele din grupurile martor și satelit (de reversibilitate), atunci când sunt sacrificate. Trebuie să se consemneze intervalul de timp între încetarea expunerii și recoltarea de sânge, în special dacă restabilirea efectului vizat este rapidă. Se recomandă prelevarea după expunere pentru acei parametri cu timp scurt de înjumătățire plasmatică (de exemplu, COHb, CHE și MetHb).

37. Tabelul 1 prezintă parametrii de patologie clinică necesari în general pentru toate studiile toxicologice. Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când se consideră util pe baza toxicității anticipate sau observate. Conducătorul studiului poate opta pentru evaluarea unor parametri suplimentari în vederea unei mai bune caracterizări a toxicității substanței chimice testate (de exemplu, colinesteraza, lipidele, hormonii, echilibrul acido-bazic, methemoglobina sau corpii Heinz, creatin-kinaza, raportul mieloid/eritroid, troponinele, gazele din sângele arterial, dehidrogenaza lactică, sorbitol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza și gama glutamil transpeptidaza).

▼M4

Tabelul 1

Parametri standard de patologie clinică

Examen hematologic	
Număr de eritrocite	Număr total de leucocite
Hematocrit	Formulă leucocitară
Concentrația de hemoglobină	Număr de plachete
Hemoglobina corpusculară medie	Potențial de coagulare (selectați unul):
Volumul corpuscular mediu	— timp de protrombină
Concentrația hemoglobinei corpusculare medii	— timp de coagulare;
Reticulocite	— timp de tromboplastină parțial
Chimie clinică	
Glucoză (*)	Alanin aminotransferază
Colesterol total	Aspartat aminotransferază
Trigliceride	Fosfatază alcalină
Azot ureic sangvin	Potasiu
Bilirubină totală	Sodiu
Creatinină	Calciu
Proteine totale	Fosfor
Albumină	Clor
Globulină	
Analiza urinei (opțional)	
Aspect (culoare și turbiditate)	Proteine totale
Volum	Glucoză
Greutate specifică sau osmolalitate	Hematurie
pH	

(*) Deoarece o perioadă îndelungată de privare de hrană poate introduce dezechilibre în măsurătorile de glucoză la animalele tratate, comparativ cu animalele din grupul martor, conducătorul studiului stabilește dacă este cazul ca animalele să fie private de hrană. În cazul în care se aplică o perioadă de privare de hrană, aceasta va fi corespunzătoare speciei folosite; pentru șobolani, perioada poate fi de 16 ore (privare de hrană pe timpul nopții). Determinarea glucozei à jeun se poate face după privarea de hrană pe timpul nopții în ultima săptămână de expunere sau după privarea de hrană pe timpul nopții înainte de autopsiere (în cazul din urmă, împreună cu toți ceilalți parametri de patologie clinică).

38. În cazul în care există dovezi că principalul loc de depunere și retenție este în căile respiratorii inferioare (adică în alveole), lavajul bronhoalveolar (BAL) poate fi tehnica de elecție pentru analiza cantitativă a parametrilor doză-efect ipotetici, cu accentul pe alveolită, inflamație pulmonară și fosfolipidoză. Aceasta permite studierea adecvată a modificărilor doză-răspuns și a evoluțiilor în timp ale leziunilor alveolare. Lichidul BAL poate fi analizat pentru determinarea numărului total de leucocite și a formulei leucocitare, a proteinelor totale și a lactat dehidrogenazei. Alți parametri care pot fi luați în considerare sunt cei care indică leziuni lizozomale, fosfolipidoză, fibroză și inflamație iritantă sau alergică, putând include determinarea citokinelor/chemokinelor pro-inflamatoare. În general, măsurătorile BAL completează rezultatele examinărilor histopatologice, dar nu le pot înlocui. Îndrumări pentru modul de efectuare a lavajului pulmonar pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

▼M4

PATOLOGIA MACROSCOPICĂ ȘI GREUTATEA ORGANELOR

39. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animalelor, sunt supuse unei evacuări complete a sângelui (dacă este posibil) și unei autopsii. Se consemnează timpul între încheierea ultimei expuneri a fiecărui animal și sacrificarea sa. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce s-a descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se efectuează imediat ce este posibil, în mod normal după o zi sau două. Toate modificările patologice majore se consemnează pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.

40. Tabelul 2 prezintă organele și țesuturile care se păstrează într-un mediu corespunzător în timpul autopsiei, în vederea unor examene histopatologice. Conservarea organelor și țesuturilor [din paranteze] și a altor organe și țesuturi rămâne la aprecierea conducătorului studiului. Organele trecute cu caractere **aldine** se curăță și se cântăresc în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Tiroida și epididimul se cântăresc doar dacă este necesar, deoarece artefactele în urma curățării pot împiedica evaluarea histopatologică. Țesuturile și organele se fixează în soluție de formol de 10 % tamponat sau în alt fixator adecvat, imediat după autopsie și la nu mai puțin de 24-48 de ore înainte de curățare, în funcție de fixatorul folosit.

Tabelul 2

Organe și țesuturi conservate în cursul autopsiei

Glande suprarenale	Vezicule seminale
Măduvă osoasă (și/sau aspirat proaspăt)	Măduva spinării (cervicală, toracică mediană și lombară)
Creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și punte)	**Splină**
[Ochi (retină, nerv optic) și pleoape]	Stomac
Inimă	**Testicule**
Rinichi	**Timus**
Laringe (3 niveluri, 1 nivel pentru a include baza epiglotei)	Tiroidă
Ficat	Trahee (minimum 2 niveluri, inclusiv o secțiune longitudinală prin carină și o secțiune transversală)
Plămân (toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale)	[Vezica urinară]
Noduli limfatici din zona hilusului pulmonar, în special în cazul substanțelor chimice testate cu particule slab solubile. Pentru examinări și studii mai aprofundate de natură imunologică, se pot lua în considerare noduli limfatici suplimentari, de exemplu cei din regiunile mediastinale, cervicale/submandibulare și/sau auriculare.	Uter
Țesuturi nazo-faringiene (minimum 4 niveluri; 1 nivel include ductul nazo-faringian și țesutul limfoid asociat mucoasei nazale (NALT)	Toate leziunile macroscopice
Esofag	
[Bulb olfactiv]	
Ovare	

▼M4

41. Plămânii se prelevează în stare intactă, se cântăresc și se tratează cu un fixator adecvat la o presiune de 20-30 cm coloană de apă, pentru a asigura conservarea structurii pulmonare (5). Secțiunile se colectează pentru toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale, dar în cazul în care se efectuează lavajul pulmonar, lobul nelavat se secționează pe trei niveluri (fără secțiuni seriale).

42. Se examinează cel puțin 4 niveluri de țesuturi nazo-faringiene, dintre care unul include ductul nazo-faringian, (5, 6, 7, 8, 9), pentru a permite examinarea adecvată a epiteliului scuamos, tranzițional (respirator neciliat), respirator (respirator ciliat) și olfactiv, precum și a țesutului limfatic de drenare (NALT; 10, 11). Se examinează trei niveluri ale laringelui, iar unul dintre aceste niveluri trebuie să includă baza epiglotei (12). Se examinează cel puțin trei niveluri ale traheei, inclusiv o secțiune longitudinală prin carina de la bifurcarea bronhiilor extrapulmonare și o secțiune transversală.

EXAMENUL HISTOPATOLOGIC

43. Se efectuează o evaluare histopatologică a tuturor organelor și țesuturilor enumerate în tabelul 2 pentru grupurile martor și grupurile de concentrație ridicată și pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificare în cursul studiului. Se acordă o atenție specială căilor respiratorii, organelor-țintă și leziunilor macroscopice. Organele și țesuturile care prezintă leziuni în grupul de concentrație ridicată se examinează la toate grupurile Conducătorul studiului poate alege să efectueze examenele histopatologice pentru grupuri suplimentare, pentru a demonstra o relație clară între concentrație și răspuns. Atunci când se folosește un grup satelit (de reversibilitate), trebuie să se efectueze un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la s-au identificat efecte în grupurile tratate. În cazul în care intervin excesiv de multe decese premature sau alte probleme în grupul cu expunere ridicată, care compromit semnificația datelor, se examinează histopatologic următorul nivel de concentrație inferioară. Se încearcă o corelare a observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

DATE ȘI RAPORT

Date

44. Trebuie să se furnizeze date individuale despre animale referitoare la greutatea corporală, consumul de hrană, patologia clinică, patologia macroscopică, greutatea organelor și examenul histopatologic. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup testat prezentându-se numărul de animale utilizate, numărul de animale care au manifestat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate din rațiuni umane, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei. Toate rezultatele cantitative și incidentale se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Se poate folosi orice metodă statistică acceptată, iar metodele statistice și datele care urmează să fie analizate se aleg în etapa de concepție a studiului.

Raportul de testare

45. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații, după caz:

Animalele testate și îngrijirea lor

— descrierea condițiilor de ținere în cuști, printre care: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de iluminat și identificarea regimului alimentar;

▼M4

— specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea altor animale decât șobolanul. Se prezintă sursa și datele anterioare în cazul în care provin de la animale expuse la condiții similare de expunere, adăpost și privare de hrană;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— metoda de randomizare;

— descrierea tuturor condițiilor dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli.

Substanța chimică testată

— natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);

— date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut.

Vehiculul

— justificarea utilizării și alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);

— date istorice sau concomitente care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului.

Incinta de inhalare

— descrierea incintei de inhalare, inclusiv volumul și o diagramă;

— sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și generarea atmosferei;

— echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, granulometriei și concentrației efective;

— sursa de aer și sistemul folosit pentru condiționare;

— metodele folosite pentru calibrarea echipamentului, pentru a asigura o atmosferă de testare omogenă;

— diferența de presiune (pozitivă și negativă);

— orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);

— stabilitatea atmosferei de testare;

— amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;

— tratarea aerului introdus/extras.

— debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (pentru expunerea întregului corp);

— timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare (t_{95});

— numărul modificărilor volumetrice pe oră;

— dispozitive de măsurare (după caz).

Datele privind expunerea

— justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;

▼M4

— concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);

— concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), fiecare poate fi analizată separat;

— toate concentrațiile în aer trebuie să fie consemnate în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m^3 etc.), mai degrabă decât în unități de volum (de exemplu, ppm, ppb etc.);

— distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică (σg), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Trebuie să se consemneze analizele granulometrice individuale.

Condițiile de testare

— detaliile preparării substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor de materiale solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate;

— descrierea (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;

— detalii privind echipamentul utilizat pentru monitorizarea temperaturii incintei, umidității și debitului de aer prin incintă (adică realizarea unei curbe de calibrare);

— detalii privind echipamentul utilizat pentru prelevarea probelor pentru determinarea concentrației în incintă și a distribuției granulometrice;

— detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);

— metoda de randomizare în evaluarea animalelor din grupurile de testare și martor;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);

— justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare.

Rezultate

— prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;

— prezentarea tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;

— prezentarea tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și σ_g;

— prezentarea tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

▼M4

— prezentarea tabelară a greutății animalelor individuale;

— prezentarea tabelară a consumului de hrană;

— prezentarea tabelară a datelor de patologie clinică;

— concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;

— prezentarea tabelară a celorlalți parametri măsurați.

Discutarea și interpretarea rezultatelor

— trebuie acordată o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;

— inhalabilitatea particulelor trebuie să fie abordată în perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot îndeplini criteriile privind granulometria;

— în evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să se includă coerența metodelor folosite pentru a determina concentrațiile nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;

— trebuie să se studieze cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);

— trebuie să se prezintă o explicație în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezentau semne de suferință gravă și prelungită, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3).

— trebuie să se identifice organul sau organele-țintă;

— trebuie să se determine NOAEL și LOAEL.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (1981), Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan J.E. și Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. În: Waalkes M.P. și Ward J.M. (eds.), Carcinogenesis, Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice, Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanță chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼B

B.9. **TOXICITATE LA DOZĂ REPETATĂ (28 DE ZILE) (ADMINISTRARE CUTANATĂ)**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B (litera A).

1.2. DEFINIȚII

A se vedea introducerea generală partea B (litera B).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se aplică zilnic substanța de testat pe cale cutanată, în doze crescătoare, mai multor loturi de testare, fiind administrată o doză pe lot timp de 28 de zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, se observă zilnic animalele pentru a pune în evidență simptomele de toxicitate Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului, sunt supuse autopsiei.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează la întâmplare în loturi tratate și loturi martor. Cu puțin timp înainte de testare, se tunde blana din regiunea dorsală a animalelor. Se poate recurge la radere, dar în acest caz operația se efectuează cu cca. 24 de ore înainte de test. Repetarea este, de obicei, necesară la intervale aproximativ săptămânale. În timpul tunderii sau al raderii, trebuie evitată orice lezare a pielii. Suprafața care se degajează în vederea aplicării substanței de testat nu trebuie să fie mai mică de 10 % din suprafața corporală. Pentru a decide zona care trebuie degajată și dimensiunile suprafeței care trebuie tratată, se ia în calcul greutatea animalului. Dacă testul vizează substanțele solide care, dacă este cazul, se pot pulveriza, substanța de testat trebuie umezită cu ajutorul apei sau, la nevoie, al unui vehicul adecvat, astfel încât să se poată obține un bun contact cu pielea. Substanțele lichide se folosesc, în general, în stare nediluată. Se efectuează o aplicare zilnică timp de 5 până la 7 zile pe săptămână.

1.6.2. **Condiții de testare**

1.6.2.1. *Animale de experiență*

Animalele de laborator utilizate sunt șobolanul, iepurele sau cobaiul adult. Pot fi folosite și alte specii, dar folosirea lor trebuie justificată.

▼B

La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie.

1.6.2.2. *Număr și sex*

Se folosesc, pentru fiecare doză, cel puțin 10 animale (5 femele și 5 masculi) a căror piele este sănătoasă. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 10 de animale (5 din fiecare sex) la doza maximă timp de 28 de zile, care poate fi supus observației vizând reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 14 zile care urmează tratamentului. Se folosește, de asemenea, un lot satelit cu 10 animale martor (5 de fiecare sex).

1.6.2.3. *Doze*

Se folosesc cel puțin trei doze, precum și un lot martor sau, dacă este cazul, un lot martor pentru vehicul. Perioada de expunere este de cel puțin șase ore pe zi. Se aplică substanța de testat în fiecare zi în același moment, iar dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a se menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Cu excepția substanței de testat, se tratează animalele din lotul martor la fel cu cele din grupul de experiment. În cazul în care se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea dozei, acesta este administrat lotului martor în aceleași condiții ca și pentru loturile tratate, iar doza administrată corespunde cu cea primită de grupul tratat cu doza maximă. Doza maximă produce efecte toxice, dar nu provoacă sau provoacă rar moartea. Doza minimă nu provoacă niciun efect toxic. Atunci când există informații privind expunerea umană, doza cea mai mică trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă minime efecte toxice observabile. În cazul în care se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund dozelor slabe și intermediare, precum și în loturile martor incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

În cazul în care aplicarea substanței de testat provoacă o iritație cutanată gravă, se reduc concentrațiile; aceasta poate avea ca efect diminuarea, chiar dispariția, celorlalte efecte toxice la doza maximă. De asemenea, dacă leziunile cutanate sunt foarte grave, poate fi necesară oprirea experimentului și inițierea unui studiu nou, la concentrații mai scăzute.

1.6.2.4. *Testul-limită*

În cazul în care în urma unei experiențe preliminare realizate cu o doză de 1 000 mg/kg sau o doză mai ridicată în funcție de expunerea umană posibilă, când se cunoaște această valoare, nu apare niciun efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă.

1.6.2.5. *Perioada de observație*

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

▼B

1.6.3. **Mod de operare**

Se pun animalele în cuști individuale. În condiții ideale, substanța de testat se administrează animalelor 7 zile pe săptămână timp de 28 de zile. Animalele din orice grup satelit destinate observației ulterioare sunt menținute în viață timp de încă 14 zile, fără tratament, în vederea constatării vindecării sau a persistenței efectelor toxice. Durata de expunere este de minimum șase ore pe zi.

Substanța de testat se aplică pe o suprafață aproximativ egală cu 10 % din suprafața totală a corpului. În cazul substanțelor puternic toxice, suprafața tratată poate fi mai mică, dar stratul trebuie să fie cât mai subțire și mai uniform posibil.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament de tifon și al unui plasture neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină pansamentul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acesteia de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă. Ca alternativă poate fi folosit un „dispozitiv de protecție cu guler înalt”.

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observațiile includ, între altele, modificări ale părului și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale sistemului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și ale sistemului nervos central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal greutatea animalelor. Se recomandă, de asemenea, determinarea săptămânală a consumului alimentar. Animalele sunt observate cu regularitate pentru a evita pe cât posibil pierderea lor din motive exterioare experimentului, precum: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul experimentului, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor tratate nesatelite. Animalele muribunde și animalele cu suferințe sau dureri grave se scot, se eutanasiază și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează la sfârșitul perioadei de testare asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

1. examen hematologic, inclusiv: hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de eritrocite, formula leucocitară și măsurători ale potențialului de coagulare;

2. determinările biochimice clinice ale sângelui cuprinzând cel puțin un parametru al funcției hepatice și unul al celei renale: alanin aminotransferaza (cunoscută anterior ca transaminaza serică glutamo-piruvică), aspartat aminotransferaza (cunoscută anterior ca transaminaza serică glutamo-oxaloacetică), azotul ureic, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale.

Alte determinări care se pot dovedi necesare pentru o evaluare toxicologică adecvată cuprind: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun, analiza lipidelor și a hormonilor, echilibrul acido-bazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică.

▼B

Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate.

1.6.4. **Autopsie**

Toate animalele supuse testului fac obiectul unei autopsii generale. Se cântăresc în stare umedă ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele cât mai rapid posibil după disecție pentru a evita deshidratarea. Se conservă într-un mediu adecvat ficatul, rinichii, splina, testiculele, glandele suprarenale și inima, precum și orice organ care prezintă leziuni macroscopice sau modificări volumetrice în vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare.

1.6.5. **Examen histopatologic**

Pentru lotul expus la doza maximă și pentru lotul martor se întreprinde un examen histopatologic al organelor și al țesuturilor conservate. Organele și țesuturile care prezintă leziuni induse pe suprafața de testare la nivelul dozei maxime se examinează în toate loturile care au fost expuse unor doze mai mici. Animalele din lotul satelit fac obiectul unui examen histopatologic axat în special pe organele și țesuturile pentru care s-au constatat leziuni în celelalte loturi tratate.

2. **DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune.

Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— date privind animalele (specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.);

— condițiile de testare (inclusiv tipul de pansament: ocluziv sau neocluziv);

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— dacă este posibil, nivelul care nu are niciun efect;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de altă natură;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— cantitățile de hrană și greutatea corporală;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele;

▼B

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, când este cazul;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B (litera D).

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B (litera E).

▼M7

B.10. TESTUL *IN VITRO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE CELULE DE MAMIFERE

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 473 a OCDE (2016). Acesta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Scopul testului *in vitro* de aberație cromozomială este de a identifica substanțele chimice care provoacă aberații cromozomiale structurale în celulele de mamifere în cultură (2) (3) (4). Aberațiile structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. Poliploidia (inclusiv endoreduplicarea) ar putea apărea în testele *in vitro* de aberație cromozomială. În timp ce substanțele aneugene pot determina poliploidie, poliploidia singură nu indică potențial aneugenic și poate indica pur și simplu perturbația ciclului celular sau citotoxicitate (5). Acest test nu este conceput pentru a măsura aneuploidia. Un test *in vitro* de micronucleu (6) ar fi recomandat pentru detectarea aneuploidiei.

Testul *in vitro* de aberație cromozomială poate să utilizeze culturi de linii celulare stabilite sau culturi de celule primare de origine umană sau de la rozătoare. Celulele utilizate se selectează în funcție de potențialul de dezvoltare în cultură, stabilitatea cariotipului (inclusiv numărul de cromozomi) și frecvența spontană a aberațiilor cromozomiale (7). În prezent, datele disponibile nu permit efectuarea de recomandări ferme, dar sugerează faptul că este important, atunci când se evaluează riscurile chimice, să se ia în considerare statutul *p53*, stabilitatea genetică (a cariotipului), capacitatea de regenerare a ADN-ului și originea celulelor (rozătoare *versus* umane) alese pentru testare. Utilizatorii acestei metode de testare sunt încurajați, prin urmare, să ia în considerare influența acestor și altor caracteristici ale celulelor privind performanța unei linii celulare în detectarea inducției de aberații cromozomiale, întrucât cunoștințele evoluează în acest domeniu.

Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testele efectuate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care celulele sunt competente din punct de vedere metabolic în ceea ce privește substanțele chimice de testat. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*. Trebuie acordată atenție pentru a evita condiții care ar putea conduce la rezultate pozitive date de artefacte, și anume, daune cromozomiale care nu sunt cauzate de interacțiunea directă dintre substanțele chimice de testat și cromozomi; astfel de condiții includ modificările de pH sau de osmolalitate (8) (9) (10), interacțiunea cu componenții din mediu (11) (12) sau valori excesive ale citotoxicității (13) (14) (15) (16).

Această testare este utilizată pentru a detecta aberațiile cromozomiale care pot rezulta din evenimente clastogene. Analiza inducției de aberații cromozomiale se realizează prin utilizarea de celule în metafază. Prin urmare, este esențial ca celulele să ajungă în mitoză atât în culturile tratate, cât și în cele netratate. În cazul nanomaterialelor fabricate, pot fi necesare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar care nu sunt descrise în prezentul document.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, trebuie să se examineze dacă, iar în caz afirmativ, din ce cauză, aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

▼M7

PRINCIPIUL TESTULUI

Culturile de celule umane sau de altă origine mamiferă sunt expuse la substanța chimică de testat în prezența și în absența unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care sunt utilizate celule cu capacitate metabolică adecvată (a se vedea punctul 13). După începutul expunerii culturilor de celule la substanța chimică de testat, acestea se tratează, la intervale de timp prestabilite și adecvate, cu o substanță chimică de inhibare a metafazei (de exemplu, colcemid sau colchicină), se recoltează, se colorează și celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidic și de tip cromozomial.

DESCRIEREA METODEI

Preparate

Celule

Se pot utiliza diferite linii celulare [de exemplu, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), celule pulmonare de hamster chinezesc V79, celule pulmonare de hamster chinezesc (CHL)/IU, TK6) sau culturi de celule primare, inclusiv limfocite din sângele periferic uman sau al altor mamifere] (7). Alegerea liniilor celulare trebuie justificată din punct de vedere științific. În cazul în care se utilizează celule primare, din motive de bunăstare a animalelor, se ia în considerare utilizarea de celule primare de origine umană atunci când este posibil și de la care s-au prelevat probe în conformitate cu principiile și reglementările etice umane. Limfocitele din sângele periferic uman se obțin de la indivizi tineri (aproximativ 18-35 de ani), nefumători, fără vreo boală cunoscută sau expuneri recente la agenți genotoxici (de exemplu, substanțe chimice, radiații ionizante) la niveluri care ar conduce la creșterea incidenței generale a aberațiilor cromozomiale. Acest lucru ar garanta incidența generală redusă și consecventă a aberațiilor cromozomiale. Incidența de bază a aberațiilor cromozomiale crește odată cu vârsta, iar această tendință este mai pronunțată la femei decât la bărbați (17) (18). În cazul în care celulele provenite de la mai mulți donatori sunt puse în comun în vederea utilizării, se precizează numărul de donatori. Este necesar să se demonstreze că celulele s-au divizat de la începutul tratării cu substanța chimică de testat în celule prelevate. Culturile de celule sunt menținute într-o fază de creștere exponențială a celulelor (linii celulare) sau sunt stimulate să se împartă (culturi primare de limfocite) pentru a expune celulele în stadii diferite ale ciclului celular, având în vedere faptul că sensibilitatea stadiilor celulelor la substanțele chimice de testat poate să nu fie cunoscută. Celule primare care trebuie să fie stimulate cu agenți mitogenici pentru a se divide nu mai sunt sincronizate, în general, în timpul expunerii la substanța chimică de testat (de exemplu, limfocitele umane după 48 de ore de la stimularea mitogenică). Utilizarea celulelor sincronizate în timpul tratamentului nu este recomandată, dar poate fi acceptabilă dacă este justificată.

Medii și condiții de cultură

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubare corespunzătoare (vasele de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO_2, după caz, temperatura de incubare de 37 °C) pentru dezvoltarea culturilor. Liniile celulare trebuie controlate în mod regulat pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu *micoplasmă* (7) (19), iar, în cazul în care se constată contaminarea sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a modificat, celulele nu se mai utilizează. Durata normală a ciclului celular al liniilor celulare sau al culturilor primare utilizate în laboratorul de testare trebuie să fie stabilită și să corespundă cu caracteristicilor celulare publicate (20).

Pregătirea culturilor

Linii celulare: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat vor continua să crească exponențial până la recoltarea acestora (de exemplu, se evită confluența celulelor care cresc în monostrat).

▼M7

Limfocite: sânge integral tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină) sau limfocite separate sunt plasate în cultură (de exemplu, pentru 48 de ore pentru limfocite umane) în prezența unui mitogen [de exemplu, fitohemaglutinină (PHA) pentru limfocite umane] pentru a determina diviziunea celulară anterior expunerii la substanța chimică de testat.

Activare metabolică

Recurgerea la un sistem endogen de activare metabolică este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate endogenă metabolică inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (21) (22) (23) sau un amestec de fenobarbital și β-naftoflavonă (24) (25) (26) (27) (28) (29). Utilizarea acestui amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (30) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (24) (25) (26) (28). Fracția S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de test final. Utilizarea de produse care reduc indexul mitotic, în special produsele de complexare cu calciu (31) se evită în timpul tratamentului. Alegerea tipului și a concentrației de sistem exogen de activare metabolică sau a inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testate.

Prepararea substanței chimice de testat

Substanțele chimice de testat în stare solidă sunt preparate în solvenți adecvați și sunt diluate, dacă este cazul, anterior tratamentului aplicat celulelor (a se vedea punctul 23). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Gazele sau substanțele chimice de testat volatile necesită o modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de vase de cultură închise ermetic (32) (33) (34). Pregătirea de preparate de substanța chimică de testat se efectuează anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care demonstrează stabilitatea acestora în condiții de stocare.

Condiții de testare

Solvenți

Solventul trebuie ales pentru a optimiza solubilitatea substanțelor chimice de testat fără a afecta desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau un mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt, de exemplu, apa sau dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu trebuie să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu trebuie să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora trebuie justificată prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanțele chimice de testat, cu sistemul de testatare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau clastogene.

Măsurarea proliferării celulare și a citotoxicității și alegerea concentrațiilor de tratament

În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, se evită concentrațiile susceptibile să producă răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 22), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 23) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 5). În cazul în care

▼M7

substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului în timpul adăugării sale, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

Măsurătorile proliferării celulare se efectuează pentru a se asigura că un număr suficient de celulele tratate au ajuns la mitoză în timpul testului și că tratamentele sunt realizate la niveluri adecvate de citotoxicitate (a se vedea punctele 18 și 22). Citotoxicitatea se determină cu și fără activare metabolică în experimentul principal, utilizând un indicator corespunzător de moarte și creștere celulară. În timp ce evaluarea citotoxicității într-un test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, un test inițial nu este obligatoriu. În cazul în care este efectuat, acesta nu trebuie să înlocuiască măsurarea citotoxicității în experimentul principal.

Dublarea relativă a populației (RPD) sau creșterea relativă a numărului de celule (RICC) reprezintă metode adecvate pentru evaluarea citotoxicității în teste citogenetice (13) (15) (35) (36) (55) (a se vedea formulele din apendicele 2). În cazul tratamentului pe termen lung și în cazul prelevării de probe după inițierea tratamentului, la intervale de timp mai mari cu de 1,5 ori durata ciclul celular normal (și anume, mai mult de 3 cicluri celulare în total), RPD ar putea subestima citotoxicitatea (37). În astfel de circumstanțe, RICC ar putea fi o măsură mai potrivită sau evaluarea citotoxicității după o perioadă de 1,5 ori durata ciclului celular normal ar fi o estimare utilă pe baza RPD.

În cazul limfocitelor din culturi primare, în timp ce indicele mitotic (MI) este o măsură a efectelor citotoxice/citostatice, acesta este influențat de timpul după tratament când se efectuează măsurătoarea, de mitogenul utilizat și de posibile perturbări ale ciclului celular. Cu toate acestea, MI este acceptabil deoarece alte măsurători de citotoxicitate pot fi dificile și nepractice și este posibil ca acestea să nu se poată aplica la populația țintă de limfocite care cresc ca răspuns la stimularea cu PHA.

În timp ce RICC și RPD reprezintă parametrii de citotoxicitate recomandați pentru liniile celulare și MI pentru cultura primară a limfocitelor, alți indicatori (de exemplu, integritatea celulară, apoptoza, necroza, ciclul celular) ar putea furniza informații suplimentare utile.

Se evaluează cel puțin trei concentrații de testat (fără a include martorii solvent și pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Indiferent de tipurile de celule (linii celulare sau culturi primare de limfocite), fiecare concentrație se poate testa fie pe culturi duplicat tratate, fie pe culturi unice tratate. În timp ce utilizarea a două culturi tratate este recomandată, culturile unice sunt acceptabile, de asemenea, cu condiția ca același număr total de celule să fie examinat atât pentru culturi unice, cât și pentru culturi duplicat. Utilizarea de culturi unice este deosebit de relevantă atunci când sunt evaluate mai mult de 3 concentrații (a se vedea punctul 31). Rezultatele obținute în culturile independente duplicat pentru o anumită concentrație pot fi grupate pentru analiza datelor (38). În cazul substanțelor chimice de testat fără citotoxicitate sau cu citotoxicitate ușoară, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate trebuie să acopere un interval de la cea care produce citotoxicitate astfel cum este descris la punctul 22 și să includă concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau fără citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante puternice, iar pentru a obține date la un nivel scăzut și moderat de citotoxicitate

▼M7

sau pentru a studia în detaliu relația doză-răspuns va fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și/sau mai mult de trei concentrații (culturi unice sau duplicat), în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 47).

În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație trebuie să vizeze atingerea unui nivel de citotoxicitate de 55 ± 5 % utilizând parametrii de citotoxicitate recomandați (și anume, reducerea RICC și RPD pentru linii celulare și reducerea de MI pentru culturile primare de limfocite la 45 ± 5 % a martorului negativ testat în paralel). Se acordă atenție deosebită interpretării rezultatelor pozitive care se găsesc numai în limita superioară a acestui interval de toxicitate de 55 ± 5 % (13).

În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă se manifestă citototoxicitate la un nivel sub concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece efecte date de artefacte pot rezulta din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului (de exemplu, colorare sau examinare). Determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment poate fi utilă.

În cazul în care nu se constată citotoxicitate sau precipitat, concentrația maximă de testare trebuie să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml or 2 μl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (39) (40) (41). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materii biologice (UVCB) (42), extract de mediu etc., concentrația maximă ar trebui să fie mai mare (de exemplu, 5 mg/ml) în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecărei componente. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (43).

Martori

Martori negativi testați în paralel (a se vedea punctul 15), constituiți dintr-un solvent singur în mediul de tratare și tratați în aceleași condiții precum culturile de tratare, trebui incluși la fiecare moment de recoltare.

Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului de identificare a substanțelor clastogene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică, după caz. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. În mod alternativ, pot fi utilizate alte substanțe chimice martor pozitive, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un clastogen care necesită activare metabolică. Acest rezultat unic al martorului pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și reactivitatea sistemului de testare, cu condiția ca acesta să fie efectuat concomitent cu testul neactivat utilizând aceeași durată de tratament. Cu toate acestea, tratamentul de lungă durată (fără S9) necesită propriul martor pozitiv deoarece durata tratamentului va fi diferită față de testul care utilizează activare metabolică. Fiecare martor pozitiv se utilizează în una sau mai multe concentrații susceptibile să determine creșteri reproductibile și detectabile ale frecvenței de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare (și anume, efectele sunt clare, dar nu dezvăluie imediat identitatea lamelor codate celui care le interpretează) și rezultatul nu trebuie să fie compromis de citotoxicitatea care depășește limitele specificate în metoda de testare.

▼M7

Tabelul 1.

Substanțe chimice de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi.

Categorie	Substanță chimică	Nr. CAS
1. Clastogeni activi fără activare metabolică		
	Metansulfonat de metil	66-27-3
	Mitomicină C	50-07-7
	4-nitrochinolină-N oxid	56-57-5
	Cistozină arabinozidă	147-94-4
2. Clastogeni care necesită activare metabolică		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciclofosfamidă	50-18-0

PROCEDURĂ

Tratamentul cu substanța chimică de testat

Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică.

Momentul recoltării culturilor

Pentru o evaluare aprofundată, necesară pentru a încheia un rezultat negativ, toate cele trei condiții experimentale următoare se efectuează cu ajutorul unui tratament de scurtă durată cu și fără activare metabolică, precum și al unui tratament pe termen lung fără activare metabolică (a se vedea punctele 43, 44 și 45):

— Celulele se expun la substanța chimică de testat fără activare metabolică timp de 36 ore și se procedează la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal după inițierea tratamentului (18),

— Celulele se expun la substanța de testat în prezența activării metabolice timp de 3-6 ore și se procedează la prelevarea probelor după un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (18),

— Celulele se expun în mod continuu fără activare metabolică până la prelevarea de probe la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal. Anumite substanțe chimice (de exemplu, nucleotide analoage) pot să fie detectate mai ușor, prin prelungirea timpului de tratament/prelevare a probelor la mai mult de 1,5 ori durata ciclului celular normal (24).

În cazul în care oricare dintre condițiile experimentale de mai sus conduc la un rezultat pozitiv, se poate să nu fie necesar să se investigheze vreun alt regim de tratament dintre celelalte.

Prepararea cromozomilor

Culturile celulare se tratează cu colcemid sau colchicină, de regulă timp de una până la trei ore înainte de recoltare. Fiecare cultură celulară se recoltează și se prelucrează separat pentru prepararea cromozomilor. Prepararea cromozomilor include tratamentul hipotonic al celulelor, precum și fixarea și colorarea acestora. În culturile monostrat pot fi prezente celule mitotice (recunoscute după

▼M7

forma rotundă a acestora și după faptul că se detașează de pe suprafață) la sfârșitul perioadei de tratament de 3-6 ore. Deoarece celulele mitotice se detașează ușor, acestea pot fi pierdute în momentul înlăturării mediului care conține substanța chimică de testat. În cazul în care există dovezi privind o creștere substanțială a numărului de celule mitotice în comparație cu martorii, indicând probabil inhibarea fazei mitotice, celulele se colectează prin centrifugare și se adaugă înapoi la culturi pentru a evita pierderea de celule în mitoză și a celor amenințate de aberația cromozomială la momentul recoltării.

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, trebuie codificate individual înaintea analizei microscopice pentru aberație cromozomială. Deoarece metodele de preparare a lamelor conduc adesea la o proporție de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate trebuie, prin urmare, să conțină un număr de centromeri egal cu numărul modal +/- 2.

Pentru fiecare concentrație și fiecare martor se examinează cel puțin 300 de celule în metafază bine etalate în vederea stabilirii unei substanțe chimice de testat ca fiind cât mai clar negativă (a se vedea punctul 45). Cele 300 celule se împart în mod egal între culturile duplicat, atunci când sunt utilizate astfel de culturi. În cazul în care se utilizează culturi unice pentru fiecare concentrație (a se vedea punctul 21), cel puțin 300 de celule în metafază bine etalate trebuie examinate pentru această cultură unică. Examinarea a 300 de celule prezintă avantajul creșterii puterii statistice a testului și, în plus, valorile nule vor fi rar constatate (se preconizează a fi doar 5 %) (44). Numărul de celule în metafază examinat poate fi redus în cazul în care se constată un număr ridicat de celule cu aberații cromozomiale, iar substanța chimică de testat este considerată cât mai clar pozitivă.

Se examinează celulele cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale), incluzând și excluzând lacunele. Rupturile și lacunele sunt definite în apendicele 1 în conformitate cu punctele 45 și 46. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial se înregistrează în mod separat și se clasifică în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Procedurile utilizate în laborator trebuie să asigure că analiza de aberație cromozomială este efectuată de către un personal bine instruit și este supusă unei evaluări inter pares, dacă este cazul.

Cu toate că scopul testului este detectarea aberațiilor cromozomiale structurale, este important să se semnaleze cazurile de poliploidie și endoreduplicare, dacă se constată apariția acestora. (A se vedea punctul 2).

Competența laboratorului

Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acesteia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul trebuie să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțele chimice de referință pozitive acționând prin diferite mecanisme și diferiți martori negativi (utilizând diferiți solvenți/vehicul). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi trebuie să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctul 37.

O serie de substanțe chimice martor pozitive (a se vedea tabelul 1 de la punctul 26) se investighează cu tratamente de scurtă și lungă durată, fără activare metabolică, precum și cu tratament de scurtă durată în prezența activării metabolice, pentru a demonstra competența de a detecta substanțele chimice clastogene și de a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică. Un interval de concentrații ale substanțelor chimice selectate se alege astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

▼M7

Date privind martorii testați anterior

Laboratorul trebuie să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții (44) (47). Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului trebuie să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C și X-bar (48)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (44). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele istorice (și anume, criteriile de includere și excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (47).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența acesteia cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

Datele privind martorii negativi trebuie să cuprindă incidența celulelor cu aberații cromozomiale de la o cultură unică sau suma dintre culturile duplicat, astfel cum este descris la punctul 21. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (44) (47). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 37) și că nu s-au înregistrat defecțiuni tehnice sau umane.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

Se evaluează procentul de celule cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale). Se întocmește separat o listă cu aberațiile de tip cromatidian și cromozomial clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi), specificând numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele se înregistrează și se prezintă în mod separat, dar nu se includ în frecvența totală a aberațiilor. Procentajul de poliploidie și/sau endoreduplicare celulară este prezentat în cazul în care acestea sunt observate.

Se înregistrează rezultatele determinărilor concomitente de citotoxicitate realizate pentru toate culturile tratate și pentru cele martor negative și pozitive în principalul (principalele) experiment(e) de aberație.

Datele se indică individual pentru fiecare cultură. În plus, toate datele sunt sintetizate sub formă de tabele.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

— Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 39.

▼M7

— Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 26) trebuie să determine răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

— Criteriile de proliferare celulară în martorul solvent de control trebuie să fie îndeplinite (punctele 17 și 18).

— Toate cele trei condiții experimentale au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (a se vedea punctul 28).

— Se analizează un număr adecvat de celule și concentrații (punctele 31 și 21).

— Criteriile de selecție ale concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 22, 23 și 24.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 28):

a) cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b) atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză,

c) oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date privind martori negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 39).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce aberații cromozomiale în celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (49) (50) (51).

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 28):

a) niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b) atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

c) toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 39).

Prin urmare, substanța chimică de testat este considerată incapabilă să provoace aberații cromozomiale în celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare.

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv astfel cum este descris mai sus sau pentru a asista la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele se evaluează de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Examinarea de celule suplimentare (dacă este cazul) sau repetarea experimentului folosind posibile condiții experimentale modificate [de exemplu, intervale dintre concentrații, alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrație S9 sau origine S9)] ar putea fi utile.

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea unei concluzii de rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat va fi stabilit ca fiind echivoc.

▼M7

O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanțele chimice de testat au potențialul să inhibe procesele mitotice și să producă aberații cromozomiale numerice (52). O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanțele chimice de testat au potențialul de a inhiba progresul ciclului celular (53) (54) (a se vedea punctul 2). Prin urmare, incidența celulelor poliploide și a celulelor cu cromozomi endoreduplicați se înregistrează separat.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă este cunoscută;

— solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent, dacă sunt cunoscute;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic, etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului.

— se indică, de asemenea, procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

— tipul și sursa celulelor;

— caracteristicile cariotipului și motivul alegerii celulelor utilizate;

— absența micoplasmei, pentru liniile celulare;

— pentru liniile celulare, informații privind durata ciclului celular, timpul de dublare sau indicele de proliferare;

— sexul donatorilor de sânge, vârsta și orice altă informație relevantă cu privire la donator, sângele integral sau limfocitele separate, mitogenul utilizat;

— numărul de pasaje, dacă este disponibil, pentru liniile celulare;

— metode de întreținere a culturilor celulare, pentru liniile celulare;

— numărul modal de cromozomi, pentru liniile celulare.

▼M7

Condițiile de testare:

— identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrațiile acesteia și timpul de expunere a celulelor;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, μg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— justificarea selectării concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;

— compoziția mediului, concentrația de CO_2, dacă este cazul, gradul de umiditate;

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura de incubare;

— timpul de incubare;

— durata tratamentului;

— perioada de recoltare după tratament;

— densitatea celulară la momentul însămânțării, dacă este cazul;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9);

— substanțe chimice martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare dintre condițiile de tratament;

— metode de preparare a lamelor și tehnica de colorare utilizată;

— criteriile pentru acceptarea testelor;

— criteriile pentru examinarea aberațiilor;

— numărul de celule în metafază analizate;

— metodele de măsurare a citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

— numărul celulelor tratate și numărul de celule recoltate pentru fiecare cultură în cazul în care se folosesc linii celulare;

— măsurători ale citotoxicității, de exemplu, RPD, RICC, MI, alte observații dacă este cazul;

— informații privind durata ciclului celular, timpul de dublare sau indicele de proliferare în cazul liniilor celulare;

— semne de precipitare și ora determinării;

▼**M7**

— definirea aberațiilor, inclusiv a lacunelor;

— numărul de celule examinate, numărul de celule care prezintă aberații cromozomiale și tipul aberațiilor cromozomiale, prezentate separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor, incluzând și excluzând lacunele;

— variațiile ploidiei (celule poliploide și celule cu cromozomi endoreduplicați avute în vedere separat) în cazul în care există;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— date privind martorii negativi testați anterior (solvenți) și pozitivi, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și numărul de date;

— analize statistice, valorile P, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", în *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, p. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells în Culture" în *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, p. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, p. 318-327.

(6) Capitolul B.49 din prezenta anexă: *Testul in vitro de micronuclee pe celule de mamifere.*

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, p. 147-204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, p. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, p. 789-886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, p. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, p. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and MolecularMutagenesis*, Vol. 35/3, p. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, p. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, p. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, p. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, p. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, p. 95-106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, p. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, p.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, p. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, p. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, p. 8390.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, p. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, p. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, p. 175-177.

▼**M7**

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, p. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, p. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibil la adresa: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, p. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", în *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, p. 91-103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, p. 795-801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, p. 122-130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), compararea diferitelor metode pentru realizarea unei evaluări precise a citotoxicității, pe testul micronucleelor in vitro. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, p. 1-3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, p. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, p. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibil la cerere

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, p. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, p. 36-43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibil la adresa: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)", Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", în *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental andMolecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", în *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens,*Mutation Research*, Vol. 287/1, p. 2946.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, p. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, p. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, p. 139-149.

▼**M7**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Apoptoză: moarte celulară programată caracterizată printr-o succesiune de etape conducând la dezintegrarea celulelor în particule membranare care sunt apoi eliminate prin fagocitoză sau excreție.

Proliferare celulară: creşterea numărului de celule ca rezultat al diviziunii celulare mitotice.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Ruptură cromatidică: discontinuitatea unei singure cromatide care prezintă în mod clar o eroare de aliniere a cromatidelor.

Lacună cromatidică: regiune necolorată (leziune acromatică) a unei singure cromatide în care există o eroare minimă de aliniere a cromatidei.

Aberație de tip cromatidic: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura cromatidelor singure sau prin ruptura și alipirea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura sau ruptura și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Clastogen: orice substanță chimică care cauzează aberații cromozomiale structurale în populații de celule sau organisme eucariote.

Concentrații: se referă la concentrații finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Citotoxicitate: Pentru testele prevăzute în această metodă de testare utilizând linii celulare, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a dublării relative a populației (RPD) sau creşterea relativă a numărului de celule (RICC) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 17 și apendicele 2). Pentru testele prevăzute în această metodă de testare utilizând culturi primare de limfocite, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a indexului mitotic (MI) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 18 și apendicele 2).

Enderoduplicare: proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN-ului, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă perioadă S. Rezultă cromozomi cu 4, 8, 16, ... cromatide.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații ale genelor, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Indice mitotic (MI): numărul celulelor în metafază împărțit la numărul total de celule observate într-o populației de celule; indică gradul de proliferare a populației respective.

Mitoză: divizarea nucleului celular, în general, descompus în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Mutagen: agent care produce o modificare ereditară uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN genic sau structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

▼M7

Aberație numerică: modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru celulele utilizate.

Poliploidie: aberații cromozomiale numerice în celule sau organisme implicând unul sau mai multe seturi întregi de cromozomi, spre deosebire de unul sau mai mulți cromozomi izolați (aneuploidie).

Status p53: proteina p53 este implicată în reglementarea circuitului de celule, apoptoză și regenerare a ADN-ului. Celulele cu deficit de proteină funcțională p53, aflate în imposibilitatea de a inhiba ciclul celular sau de a elimina celulele deteriorate prin intermediul apoptozei sau al altor mecanisme (de exemplu, inducția de regenerare de ADN) relaționate cu funcțiile p53 ca răspuns la deteriorarea ADN-ului, sunt teoretic mai predispuse la mutații ale genelor sau aberații cromozomiale.

Creșterea relativă a numărului de celule (RICC): creșterea numărului de celule în culturile expuse la substanța chimică față de creșterea în culturile netratate, un raport exprimat ca procent.

Dublarea relativă a populației (RPD): creșterea numărului de dublări ale populației în culturile expuse la substanța chimică față de creșterea în culturile netratate, un raport exprimat ca procent.

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amestecul S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metabolică a enzimelor.

Martor solvent: termen general pentru a defini culturile martor care primesc solventul singur utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Aberație structurală: modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

Martori netratați: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nicio substanță chimică de testat sau solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

▼M7

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚI

Indice mitotic (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Număr de celule mitotice}}{\text{Număr total de celule examinate}} \times 100$$

Se recomandă **creștere relativă a numărului de celule (RICC)** sau **dublarea relativă a populației (RPD)**, întrucât ambele iau în considerare proporția de celule care au efectuat o diviziune celulară.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Creșterea numărului de celule în culturile tratate(la final–la început)})}{(\text{Creșterea numărului de celule în culturile martor(la final–la început)})} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nr.de dublări de populație în culturile tratate})}{(\text{Nr.de dublări de populație în culturile martor})} \times 100$$

unde:

Dublarea populației = [log (numărul de celule post-tratament ÷ numărul inițial de celule)] ÷ log 2

De exemplu, o RICC sau o RPD de 53 % indică 47 % citotoxicitate/citostază și 55 % citotoxicitate/citostază măsurată prin MI, însemnând că MI este 45 % din martor.

În orice caz, se măsoară numărul de celule înainte de tratament, iar același lucru se efectuează atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor negative.

În timp ce RICC (și anume, numărul de celule în culturile tratate/numărul de celule în culturile martor) a fost utilizată ca parametru de citotoxicitate în trecut, aceasta nu mai este recomandată deoarece poate subestima citotoxicitatea.

În culturile martor negative, dublarea populației trebuie să fie compatibilă cu cerința prelevării de probe a celulelor după tratament la un interval de timp egal cu de 1,5 ori durata ciclului celular normal și indicele mitotic trebuie să fie destul de crescut pentru a obține un număr suficient de celule în mitoză și pentru a calcula într-un mod fiabil o reducere de 50 %.

▼M7

B.11. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ ÎN MĂDUVA OSOASĂ DE MAMIFERE

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 475 a OCDE (2016). Acesta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vivo* de aberație cromozomială pe măduva osoasă de mamifere este relevant în special pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că pot varia între specii, factorii de metabolism *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare de ADN sunt active și contribuie la răspunsuri. Un test *in vivo* este util, de asemenea, pentru investigarea suplimentară a genotoxicității detectate de un sistem *in vitro*.

Testul *in vivo* de aberație cromozomială la mamifere este utilizat pentru detectarea aberațiilor cromozomiale provocate de substanțele chimice de testat în structura celulelor din măduva osoasă a mamiferelor, de regulă, rozătoare (2) (3) (4) (5). Aberații cromozomiale structurale pot fi de două tipuri, cromozomiale sau cromatidice. În timp ce majoritatea aberațiilor induse prin substanța chimică sunt de tip cromatidic, se produc, de asemenea aberații de tip cromozomial. Leziunile cromozomiale și fenomenele conexe sunt cauza multor maladii genetice umane și există dovezi substanțiale că, atunci când aceste leziuni și fenomene conexe provoacă modificări ale oncogenelor și ale genelor supresoare de tumori, acestea sunt implicate în inducerea cancerului la oameni și în sistemele experimentale. Poliploidia (inclusiv endoreduplicarea) ar putea apărea în testele *in vivo* de aberație cromozomială. Cu toate acestea, o creștere a numărului de celule poliploide în sine nu indică potențial aneugenic și poate indica pur și simplu perturbarea ciclului celular sau citotoxicitate. Acest test nu este conceput pentru a măsura aneuploidia. Un test *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (capitolul B.12 din prezenta anexă) sau testul *in vitro* de micronucleu pe celule de mamifere (capitolul B.49 din prezenta anexă) ar fi testele *in vivo* și, respectiv, *in vitro* recomandate pentru detectarea aneuploidiei.

Definiții ale terminologiei utilizate sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

Rozătoarele sunt utilizate în mod obișnuit în acest test, dar utilizarea altor specii poate fi adecvată în unele cazuri, dacă este justificată din punct de vedere științific. Țesutul-țintă în acest test este măduva osoasă, întrucât este un țesut puternic și conține o populație de celule cu ciclu rapid care se pot izola și prelucra ușor. Justificarea din punct de vedere științific a utilizării altor specii decât șobolanii și șoarecii se indică în raport. În cazul în care sunt utilizate alte specii decât rozătoare, se recomandă ca măsurarea aberației cromozomiale în măduva osoasă să fie integrată în alt test de toxicitate corespunzător.

În cazul în care există dovezi că substanța (substanțele) chimică(e) de testat sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu vor ajunge la țesutul țintă, este posibil ca utilizarea acestui test să nu fie potrivită.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se examinează dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

▼M7

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Animalele sunt expuse la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt eutanasiate în condiții umane la momentul corespunzător după tratament. Înainte de eutanasiere, animalele se supun tratamentului cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colchicină sau colcemid). Ulterior, din celulele de măduvă osoasă se realizează preparate cromozomiale care se colorează și celulele în metafază se examinează pentru a pune în evidență aberațiile cromozomiale.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Verificări de competență

Pentru a stabili experiența suficientă în efectuarea testului înainte de a-l utiliza pentru testele de rutină, laboratorul trebuie să fi demonstrat capacitatea de a reproduce rezultatele așteptate în urma informațiilor publicate [de exemplu, (6)] pentru frecvențe de aberații cromozomiale cu un minim de două substanțe chimice martor pozitive (inclusiv răspunsurile slabe cauzate de doze scăzute de martori pozitivi) precum cele enumerate în tabelul 1 și cu martori vehicul/solvent compatibili (a se vedea punctul 22). Aceste experimente utilizează doze care produc creșteri reproductibile și legate de doză și demonstrează sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare în țesutul de interes (măduva osoasă) utilizând metoda de examinare care urmează să fie utilizată în cadrul laboratorului. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care dețin o bază de date anterioare disponibilă astfel cum este definit la punctele 10-14.

Date privind martorii testați anterior

Pe parcursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior, precum și

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții. Baza de date privind martorii negativi testați anterior trebuie să fie solidă din punct de vedere statistic pentru a asigura capacitatea laboratorului de a evalua distribuția datelor sale privind martorii negativi. Referințele bibliografice sugerează că poate fi necesar un minim de 10 experimente, dar ar trebui, de preferință, ca baza de date să fie constituită din cel puțin 20 experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității, cum ar fi grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X-bar (7)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectivul laborator. Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (8).

În cazul în care laboratorul nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor negativi solidă din punct de vedere statistic (a se vedea punctul 11) în timpul verificărilor de competență (descrise la punctul 9), se acceptă posibilitatea elaborării distribuției în timpul primelor teste de rutină. Această abordare trebuie să respecte recomandările stabilite în referințele bibliografice (8), iar rezultatele martorilor negativi obținute în aceste experimente trebuie să rămână în conformitate cu datele publicate cu privire la martorii negativi.

▼M7

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește impactul acesteia asupra datelor rezultate, care trebuie să fie în conformitate cu baza de date existentă privind martorii testați anterior a laboratorului. Doar inconsecvențele majore conduc la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior, în cazul în care opiniile experților stabilesc faptul că acestea diferă față de distribuția anterioară (a se vedea punctul 11). În timpul procesului de restabilire, o bază completă de date cu privire la martorii negativi nu este neapărat necesară pentru a permite efectuarea unui test propriu-zis, cu condiția ca laboratorul să poată demonstra că valorile martor negative ale acestuia rămân consecvente fie cu bazele de date anterioare aferente, fie cu datele publicate corespunzătoare.

Datele cu privire la martorii negativi trebuie să cuprindă incidența aberațiilor cromozomiale structurale (cu excepția lacunelor) pentru fiecare animal. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale distribuției bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția de martori testați anterior în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 11) și că nu s-au înregistrat defecțiuni tehnice sau umane.

DESCRIEREA METODEI

Preparate

Selectarea speciilor de animale

Se utilizează șușe utilizate în mod curent în laborator, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. Se utilizează, de regulă, șobolani, cu toate că se pot utiliza și șoareci. Orice altă specie adecvată de mamifere poate fi utilizată, în cazul în care se furnizează justificarea științifică în raport.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice de testat în cazul administrării prin această metodă. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci pentru fiecare cușcă) de același sex și grup supus tratamentului, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv, de preferință în cuști cu pardoseală solidă cu îmbogățire adecvată a mediului de viață. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

Se utilizează în mod normal animale adulte, tinere, sănătoase (pentru rozătoare, de preferință, de 6-10 săptămâni la începutul tratamentului, deși animale puțin mai în vârstă sunt, de asemenea, acceptabile), care sunt distribuite în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele sunt identificate individual prin utilizarea unei metode umane, foarte puțin invazive (de exemplu, prin marcare cu inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și sunt aclimatizate la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile se dispun astfel încât posibilele efecte datorate amplasării în cușcă să fie reduse la minim. Se evită contaminarea încrucișată dintre martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor trebuie să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Pregătirea dozelor

Substanțele de testat în stare solidă se dizolvă sau se pun în suspensii în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau se amestecă în alimente sau în apa de băut înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare

▼M7

lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora. Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării și definesc condițiile de stocare corespunzătoare.

Solvent/vehicul

Solventul/vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu trebuie să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Exemple de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit includ apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori care să ateste faptul că nicio aberație cromozomială de structură sau alte efecte vătămătore nu sunt induse de un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

Martori

Martori pozitivi

Pentru fiecare test se include, în mod normal, un grup de animale tratate cu o substanță chimică martor pozitivă. Acest lucru poate fi eliminat în cazul în care laboratorul de testare a demonstrată competență în efectuarea testului și a stabilit un interval de martori pozitivi anteriori. În cazul în care nu este inclus un grup de martori pozitivi testați în paralel, în fiecare experiment se includ martori examinați (lame fixate și necolorate). Aceștia pot fi obținuți prin includerea în sistemul de examinare a studiului de probe de referință adecvate care au fost obținute și păstrate în urma unui experiment separat cu martori pozitivi efectuat periodic (de exemplu, la fiecare 6-18 luni) în cadrul laboratorului în care se efectuează testul, de exemplu, în timpul testărilor de competență și ulterior în mod regulat, dacă este necesar.

Substanțele chimice martor pozitive trebuie să producă în mod fiabil o creștere detectabilă în ceea ce privește frecvența celulelor cu aberații cromozomiale structurale față de nivelul spontan. Dozele de martor pozitiv se aleg astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinatorului identitatea probelor codate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul substanței chimice de testat, folosind o schemă de tratament diferită și o singură prelevare de probe. În plus, utilizarea de martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice poate fi luată în considerare, după caz. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Tabelul 1.

Exemple de substanțe chimice martor pozitive

Substanță chimică	Nr. CAS
Metansulfonat de etil	62-50-0
Metansulfonat de metil	66-27-3
Etil nitrozouree	759-73-9
Mitomicină C	50-07-7
Ciclofosfamidă (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelamină	51-18-3

▼M7

Martori negativi

Animalele din grupul martor negativ se iau în considerare la fiecare prelevare de probe și se manipulează de altfel în aceeași modalitate ca grupurile tratate, cu excepția faptului că nu beneficiază de tratamentul cu substanța chimică de testat. În cazul în care un solvent/vehicul este utilizat pentru administrarea substanței chimice de testat, acesta se administrează grupului martor. Cu toate acestea, în cazul în care coerența variabilității inter-animale și frecvențele celulelor cu aberații structurale sunt demonstrate de datele privind martorii negativi testați anterior la fiecare prelevare de probe efectuată de laboratorul de testare, ar putea fi necesară o singură prelevare de probe pentru martorul negativ. În cazul în care se utilizează o singură prelevare de probe pentru martorii negativi, aceasta trebuie să fie prima prelevare de probe utilizată în cadrul studiului.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

În general, reacția de micronucleu este similară între masculi și femele (9) și se preconizează că acest lucru va fi valabil, de asemenea, pentru aberațiile cromozomiale structurale; prin urmare, majoritate studiilor pot fi efectuate pe oricare dintre sexe. Date care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate, toxicitate în măduva osoasă, etc., inclusiv, de exemplu, un studiu de stabilire a dozelor) ar încuraja utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu în cazul ambelor sexe, de exemplu, ca parte a unui studiu de toxicitate cu doză repetată. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modul de analiză a datelor care utilizează acest model.

Dimensiunea grupurilor la începerea studiului se stabilește cu scopul de a furniza pentru fiecare grup cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează utilizând sexul corespunzător. Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu pe măduva osoasă din două prelevări de probe cu trei grupuri de dozaj și un grup martor negativ testat în paralel, la care se adaugă un grup martor pozitiv (fiecare grup alcătuit din cinci animale de același sex) ar necesita 45 de animale.

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se realizează în același laborator, utilizând aceeași specie, șușă, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (10). Studiul are ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită drept doza cea mai ridicată care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, prin reducerea greutății corporale sau a citotoxicității sistemului hematopoietic, dar nu deces sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere în condiții umane (11)].

Doza maximă mai poate fi definită ca doza care produce unele semne de toxicitate în măduva osoasă.

Substanțele chimice care prezintă saturație a proprietăților toxicocinetice sau provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după un tratament pe termen lung pot reprezenta excepții de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ și un minim de trei niveluri de doze separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța

▼M7

chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare este de 2 000 mg/kg greutate corporală. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT trebuie să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate trebuie, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (măduva osoasă) la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au ca scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot solicita grupuri suplimentare de dozare. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia.

Test limită

În cazul în care experimentele pentru stabilirea intervalului sau datele existente legate de șușele de animale indică faptul că un regim de tratament de cel puțin doza limită (descrisă mai jos) nu produce efecte toxice detectabile, (inclusiv nicio diminuare a proliferării măduvei osoase sau alte semne de citotoxicitate în țesutul țintă) și în cazul în care genotoxicitatea este improbabilă pe baza studiilor *in vitro* de genotoxicitate sau a datelor provenite de la substanțele chimice cu o structura apropriată, atunci este posibil ca un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite să nu fie considerat necesar dacă s-a demonstrat că substanța (substanțele) chimică(e) de testat ajung(e) la țesutul țintă (măduva osoasă). În astfel de cazuri, un singur nivel de doză, la doza limită, poate fi suficient. Pentru o perioadă de administrare > 14 zile, doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru perioadele de administrare de 14 zile sau mai puțin, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese după caz. În orice caz, calea trebuie aleasă pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injectarea peritoneală nu este recomandată, în general, deoarece nu este o cale destinată expunerii umane și se utilizează doar cu anumite justificări științifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și prelevarea de probe, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctele 33-34). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se poate administra un maxim de 2 ml/100 g. Utilizarea unor volume mai mari decât cele menționate se justifică. Exceptând substanțele chimice de testat iritante sau corozive, care vor prezenta, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat se reduce la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure administrarea unui volum constant în raport cu greutatea corporală pentru toate dozele.

Schema de tratament

Substanțele chimice de testat se administrează, în mod normal, o singură dată, dar se pot administra, de asemenea, în doză fracționată (și anume, două sau mai multe tratamente în aceeași zi la distanță de doar 2-3 ore) pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste circumstanțe sau atunci când substanța chimică de testat este administrată prin inhalare, momentul de prelevare de probe trebuie programat în funcție de ultima administrare a dozei sau de sfârșitul expunerii.

Există puține date disponibile cu privire la gradul de adecvare al unui protocol cu doză repetată pentru efectuarea acestui test. Cu toate acestea, în cazurile în care se dorește integrarea acestui test cu un test de toxicitate la doze repetate, se

▼M7

acordă atenție deosebită pentru a evita pierderea de celule mitotice cu leziuni cromozomiale astfel cum se întâmplă cu doze toxice. O astfel de integrare este acceptabilă în cazul în care doza maximă este mai mare sau egală cu doza limită (a se vedea punctul 29) și la un grup de dozare se administrează doza limită pe durata perioadei de tratament. Testul pe micronucleu (metoda de testare B.12) se consideră testul *in vivo* agreat pentru aberații cromozomiale în cazul în care se dorește integrarea cu alte studii.

Se efectuează prelevarea de probe de măduva osoasă în două momente diferite în urma tratamentelor unice. Pentru rozătoare, primul interval de prelevare de probe trebuie să fie perioada necesară pentru a completa de 1,5 ori durata ciclului celular normal (acesta din urmă fiind în mod normal de 12-18 ore după perioada de tratament). Având în vedere faptul că timpul necesar pentru absorbția și metabolizarea substanței (substanțelor) chimice de testat, precum și acțiunea acesteia (acestora) asupra cineticii ciclului celular poate avea efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se recomand să se procedeze la o altă prelevare de probe la 24 de ore după prima prelevare. După prima prelevare de probe, se tratează toate grupurile de dozare și se colectează probele pentru analiză; cu toate acestea, la ultima (ultimele) prelevare (prelevări) de probe se administrează doar dozele maxime. În cazul în care sunt utilizate regimuri de dozare de mai mult de o zi pe baza unor justificări științifice, se procedează la o prelevare de probe la un interval de timp de până la de 1,5 ori durata ciclului celular normal după tratamentul final.

După tratament și înainte de colectarea probelor, animalele se injectează intraperitoneal cu o doză corespunzătoare de agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colcemid sau colchicină), iar probele sunt colectate ulterior la un interval corespunzător. Intervalul respectiv este de aproximativ 3-5 ore înaintea colectării în cazul șoarecilor și de 2-5 ore pentru șobolani. Celulele se recoltează din măduva osoasă, se umflă, se fixează se colorează și se analizează pentru aberații cromozomiale (12).

Observații

Se recomandă efectuarea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, toate animalele se examinează cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele se cântăresc la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doză repetată și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, consumul de hrană se măsoară cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, consumul de apă se măsoară la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasiază în condiții umane înainte de încheierea perioadei de testare (11).

Expunerea țesutului țintă

Se prelevează o probă de sânge la momentul (momentele) adecvat(e) pentru de a permite investigarea nivelurilor plasmatice ale substanțelor chimice de testat cu scopul a demonstra faptul că măduva osoasă a fost expusă, acolo unde este cazul și unde nu există alte date de expunere (a se vedea punctul 44).

Măduva osoasă și preparatele cromozomiale

Imediat după eutanasierea în condiții umane, celule de măduvă osoasă se extrag din femurul sau tibia animalelor, se expun la o soluție hipotonică și se fixează. Celulele în metafază se întind apoi pe lame și se colorează prin metodele stabilite (a se vedea punctele 3-12).

▼M7

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele de la martorii pozitivi și negativi, sunt codificate independent înainte de analiză și sunt randomizate astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament.

Se determină indicele mitotic ca o măsură a citotoxicității, pe cel puțin 1000 de celule pe animal pentru toate animalele tratate (inclusiv martorii pozitivi), netratate sau animalele martori negativi tratate cu un vehicul/solvent.

Pentru fiecare animal se analizează cel puțin 200 de celule în metafază pentru a evidenția aberații cromozomiale structurale, incluzând și excluzând lacunele (6). Cu toate acestea, în cazul în care baza de date privind martorii negativi testați anterior indică faptul că valoarea medie a frecvenței aberațiilor cromozomiale structurale de fond este < 1 % în laboratorul de testare, se ia în considerare examinarea de celule suplimentare. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial se înregistrează separat și se clasifică în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Procedurile utilizate în laborator trebuie să asigure că analiza aberațiilor cromozomiale este efectuată de un personal bine instruit și este supusă unei evaluări inter pares, dacă este cazul. Recunoscând faptul că metodele de preparare a lamelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate trebuie, prin urmare, să conțină un număr de centromeri nu mai mic de $2n \pm 2$, unde n este numărul haploid de cromozomi pentru specia respectivă.

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Pentru fiecare animal, se evaluează indicele mitotic, numărul de celule în metafază examinate, numărul de aberații pentru fiecare celulă în metafază și procentul de celule cu aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale). Diferitele tipuri de aberații cromozomiale structurale se enumeră împreună cu numărul și frecvența acestora pentru grupurile tratate și pentru cele martor. Se înregistrează separat lacunele, precum și celulele poliploide și celulele cu cromozomi endoreduplicați. Se raportează frecvența lacunelor, dar, în general, aceasta nu se include în analiza frecvenței totale a aberațiilor structurale. În cazul în care nu există dovezi privind diferența de răspunsuri între sexe, datele se pot combina pentru analiza statistică. Datele cu privire la toxicitatea animală și semnele clinice trebuie, de asemenea, să fie raportate.

Criterii de acceptabilitate

Următoarele criterii determină acceptabilitatea testului:

a) Datele privind martorii negativi testați în paralel sunt considerate acceptabile pentru adăugarea la baza de date cu privire la martorii testați anterior (a se vedea punctele 11-14);

b) Martorii pozitivi testați în paralel sau martorii examinați trebuie să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date cu privire la martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 20-21);

c) A fost analizat un număr corespunzător de doze și celule;

d) Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctele 25-28.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

▼M7

a) cel puțin unul dintre grupurile tratate prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de celule cu aberații cromozomiale structurale (excluzând lacunele) comparativ cu martorul negativ testat în paralel,

b) această creștere este raportată la doză cel puțin la un moment de prelevare de probe atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței și

c) oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson).

În cazul în care se analizează doar doza maximă la un anumit moment de prelevare de probe, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ testat în paralel, iar rezultatele se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control 95 % pe baza distribuției Poisson). Referințele bibliografice prezintă recomandări privind metode statistice adecvate (13). La efectuarea unei analize a relației doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri tratate de dozare. Testele statistice utilizează animalul ca unitate experimentală. Rezultatele pozitive ale unui test de aberație cromozomială indică faptul că substanța chimică de testat induce aberații cromozomiale structurale în măduva osoasă a speciei testate.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate:

a) Niciuna dintre grupele tratate nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de celule cu aberații cromozomiale structurale (excluzând lacunele) în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b) Nu există nicio creștere raportată la doză indiferent de momentul prelevării, atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței,

c) Toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson) și

d) Măduva osoasă a fost expusă la substanța (substanțele) chimică(e) de testat.

Referințele bibliografice prezintă recomandări privind cele mai adecvate metode statistice (13). Dovezi ale expunerii măduvei osoase la o substanță chimică de testat pot include o diminuare a indicelui mitotic sau măsurarea concentrațiilor plasmatice sau sangvine din substanța (substanțele) chimică(e) de testat. În cazul administrării intravenoase, nu sunt necesare dovezi de expunere. În mod alternativ, datele ADME, obținute în cadrul unui studiu independent utilizând aceeași cale și aceeași specie, pot fi utilizate pentru a demonstra expunerea măduvei osoase. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța chimică de testat nu provoacă aberații cromozomiale structurale în măduva osoasă a speciei testate.

În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru contribui la stabilirea relevanței biologice a rezultatului (de exemplu, o creștere slabă sau de limită), datele se evaluează de către experți și/sau prin investigații suplimentare realizate pe experimentele existente. În unele cazuri, analizarea mai multor celule sau repetarea experimentului utilizând condiții de testare modificate ar putea fi utile.

▼M7

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, datele vor exclude posibilitatea unui rezultat pozitiv sau negativ al substanței chimice de testat și, prin urmare, se va concluziona că studiul este echivoc.

Frecvența celulelor poliploide și enderoduplicate în metafază în cadrul numărului total de celule în metafază se înregistrează separat. O creștere a numărului de celule poliploide/enderoduplicate poate să indice faptul că substanța chimică de testat este capabilă să inhibe procesele mitotice sau avansarea ciclului celular (a se vedea punctul 3).

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Rezumat

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

— aspect fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— caracterizată, în măsura în care este posibil, prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;

— prepararea formulărilor hranei, apei potabile sau inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animalele de experiență:

— specia/șușă utilizată și justificarea utilizării;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metoda de identificare unică a animalelor;

— pentru studiile pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui animal la începutul și sfârșitul testului; pentru studiile cu durata mai mare de o săptămână: greutatea corporală a fiecărui animal pe durata studiului și consumul de hrană. Se include intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

▼**M7**

Condițiile de testare:

— martori pozitivi și negativi (vehicul/solvent);

— datele din studiul pentru stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;

— justificarea alegerii nivelului dozei administrate;

— detaliile privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;

— justificarea căii și a duratei de administrare;

— metodele de verificare pentru a constata dacă substanța (substanțele) chimică(e) de testat a (au) ajuns în circulația generală sau în măduva osoasă;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) și în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— metoda de eutanasiere;

— metoda de analgezie (atunci când se utilizează);

— descrierea amănunțită a schemelor de tratare și de prelevare a probelor și justificările alegerilor;

— metodele de preparare a lamelor;

— metodele de măsurare a toxicității;

— identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrația acesteia, doza și timpul de administrare înainte de prelevare;

— proceduri pentru izolarea și conservarea probelor;

— criteriile pentru examinarea aberațiilor;

— numărul de celule în metafază analizate per animal și numărul de celule analizate pentru determinarea indicelui mitotic;

— criterii de acceptabilitate a studiului;

— criteriile utilizate pentru caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau neconcludente.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata testului, inclusiv semne de toxicitate;

— indicele mitotic, prezentat separat pentru fiecare animal;

— tipul și numărul aberațiilor și celulelor aberante, prezentat separat pentru fiecare animal;

— numărul total de aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

— numărul de celule cu aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

— variațiile ploidiei, dacă există, inclusiv frecvența celulelor poliploide și/sau enderoduplicate;

▼**M7**

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— analizele statistice și metodele aplicate;

— date care să demonstreze că a avut loc expunerea măduvei osoase;

— date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior în paralel, cu intervale, valori medii și deviații standard;

— date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și perioada de timp acoperită și numărul de observații;

— criteriile îndeplinite pentru un răspuns pozitiv sau negativ.

Discutarea rezultatelor.

Concluzie.

Referințe.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals”, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, p. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, p. 157-165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays”, în Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, p. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, p. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, p. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, p. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, p. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, în Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 184-232.

▼**M7**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneuploidie: Orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu prin multiplicarea unui (unor) set (seturi) întreg(i) de cromozomi (a se vedea poliploidie).

Centromer: Regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Aberație de tip cromatidic: O leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin ruperea cromatidelor singure sau prin ruperea și reuniunea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: O leziune structurală a cromozomului, care se traduce prin ruperea sau ruperea și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Endoreduplicare: Proces în care, după o perioadă S de replicare a ADN, nucleul nu intră în mitoză, ci începe o altă perioadă S. Rezultă cromozomi cu 4,8,16,... cromatide.

Lacună: Leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

Indice mitotic: Raportul dintre numărul de celule în mitoză și numărul total de celule într-o populație, care este o măsură a statusului de proliferare a respectivei populații celulare.

Aberație numerică: Modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru animalele utilizate (aneuploidie).

Poliploidie: O aberație cromozomială numerică care implică o modificare a numărului întregului set de cromozomi, spre deosebire de o modificare numerică a unei părți a setului de de cromozomi (a se vedea aneuploidia).

Aberație cromozomială structurală: O modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼M7

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL DE IDENTIFICARE A DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL *IN VIVO* DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ

Modelul factorial și analiza acestuia

În cadrul acestui model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Acest model, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a variației, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea din setul de date în cea dintre sexe, dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității dintre animalele replică în cadrul grupurilor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a concentrației sexului x în tabelul ANOVA ([1]). În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratice ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă a concentrației sexului x, această condiție poate fi împărțită, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau dacă există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru diferite niveluri de concentrație, cum ar fi cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor pentru aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de concepere a experimentelor. Lista de mai jos este o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple concrete de modele comparabile, în unele cazuri codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

([1]) Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul anova tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor, elaborate în epoca de dinaintea computerului.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. **TESTUL DE MICRONUCLEU PE ERITROCITE DE MAMIFERE**

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea nr. 474 a OCDE (2016). Aceasta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere este relevant în special pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că pot să varieze între specii, factorii de metabolism *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare a ADN sunt active și contribuie la răspunsuri. Un test *in vivo* este util, de asemenea, pentru investigarea suplimentară a genotoxicității detectate de un sistem *in vitro*.

Testul *in vivo* de micronucleu pe celule de mamifere se utilizează pentru detectarea leziunilor induse de substanța chimică de testat asupra cromozomilor sau asupra aparatului mitotic al eritroblaștilor. Testul evaluează formarea de micronuclee în eritrocitele prelevate fie din măduva osoasă, fie din celulele sângelui periferic ale animalelor, de regulă, rozătoare.

Scopul testului de micronucleu este identificarea substanțelor chimice care produc leziuni citogenetice care determină formarea de micronuclee conținând fragmente de cromozomi sau cromozomi întregi întârziați.

Atunci când un eritroblast din măduva osoasă evoluează într-un eritrocit imatur (denumit uneori și eritrocit policromatic sau reticulocit), nucleul principal este expulzat; orice nucleu care se formează poate să rămână în citoplasmă. Micronucleele se vizualizează sau se detectează mai ușor în aceste celule deoarece le lipsește nucleul principal. O creștere a frecvenței eritrocitelor imature micronucleate la animalele tratate indică producerea unei aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică.

Eritrocite micronucleate nou-formate sunt identificate și numărate prin colorare, fiind evaluate apoi fie prin examinarea vizuală, utilizând un microscop, fie prin analiză automată. Numărarea de suficiente eritrocite imature din sângele periferic sau măduva osoasă a animalelor adulte este facilitată în mare măsură de utilizarea unei platforme automate de examinare. Astfel de platforme reprezintă alternative acceptabile ale evaluării manuale (2). Studiile comparative au arătat că astfel de metode, utilizând standarde de calibrare adecvate, pot oferi o sensibilitate și reproductibilitate intra- și inter-laboratore mai bună decât examinarea microscopică manuală (3) (4). Sisteme automate care pot măsura frecvențele de eritrocite micronucleate includ, dar nu se limitează la, citometre de flux (5), platforme de analiză a imaginilor (6) (7) și citometre cu scanare laser (8).

Deși acest lucru nu este efectuat în mod normal ca parte a testului, fragmentele de cromozomi se pot distinge de cromozomii întregi printr-o serie de criterii. Unul dintre acestea este identificarea prezenței sau absenței unui kinetocor sau ADN centromeric, ambii fiind caracteristici cromozomilor întregi. Absența unui kinetocor sau ADN centromeric indică faptul că micronucleul conține doar fragmente de cromozomi, în timp ce prezența indică pierderea de cromozomi.

Definiții ale terminologiei utilizate sunt prevăzute în apendicele 1.

▼M7

CONSIDERAȚII INIȚIALE

Măduva osoasă de la rozătoare adulte tinere este țesutul țintă pentru leziuni genetice în cadrul acestui test, având în vedere faptul că eritrocitele sunt produse în acest țesut. Măsurarea micronucleelor în eritrocitele imature în sângele periferic este acceptabilă la alte specii de mamifere a căror sensibilitate specifică pentru detectarea substanțelor chimice care produc aberații cromozomiale de natură structurală sau numerică a fost demonstrată (prin inducție de micronuclee în eritrocitele imature), pe baza unei justificări stiințifice. Frecvența eritrocitelor imature micronucleate reprezintă criteriul principal. Frecvența eritrocitelor mature care conțin micronuclee în sângele periferic poate fi utilizată, de asemenea, drept criteriu la speciile fără o selecție splenică puternică împotriva celulelor micronucleate și în cazul în care animalele sunt tratate în mod continuu pentru o perioadă care depășește durata de viață a eritrocitelor la speciile utilizate (de exemplu, 4 săptămâni sau mai mult la șoareci).

În cazul în care există dovezi că substanța (substanțele) chimică(e) de testat sau metabolitul (metaboliții) specific(i) nu va (vor) ajunge la țesutul țintă, utilizarea acestui test ar putea să nu fie potrivită.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera datele în scopul unui obiectiv de reglementare specific, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză, aceasta poate oferi rezultate adecvate în respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se expun animalele la substanța de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. În cazul în care se utilizează măduvă osoasă, animalele sunt eutanasiate în condiții umane la un moment adecvat după tratament, se extrage măduva osoasă, se prepară și se colorează lamele (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Atunci când se utilizează sânge periferic, acesta se colectează la un moment(e) adecvat(e) după tratament, se prepară și se colorează lamele (12) (16) (17) (18). Atunci când tratamentul este administrat acut, este important să se selecteze momente de recoltare a măduvei osoase sau a sângelui în care inducția eritrocitelor imature micronucleate provocată de tratament poate fi detectată. În cazul prelevării de probe din sângele periferic, o perioadă suficientă de timp trebuie, de asemenea, să treacă pentru ca aceste evenimente să apară în sângele în circulație. Lamele preparate se examinează pentru a depista prezența micronucleelor, fie prin vizualizare utilizând un microscop, prin analizarea imaginii, prin citometria în flux sau citometria cu scanare laser.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Verificările de competență

Pentru a stabili o experiență suficientă în efectuarea testului înainte de a-l utiliza pentru testele de rutină, laboratorul trebuie să fi demonstrat capacitatea de a reproduce rezultatele așteptate în urma datelor publicate (17) (19) (20) (21) (22) pentru frecvența micronucleelor cu minimum două substanțe chimice martor pozitive (inclusiv răspunsurile slabe cauzate de doze scăzute de martori pozitivi), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1 și cu martori vehicul/solvent compatibili (a se vedea punctul 26). Aceste experimente utilizează doze care produc creșteri reproductibile și legate de doză și demonstrează sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare în țesutul de interes (măduva osoasă sau sânge periferic), utilizând metoda de examinare care urmează să fie utilizată în cadrul laboratorului. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, care dețin o bază de date anterioare disponibilă astfel cum este definit la punctele 14-18.

Date privind martorii testați anterior

Pe parcursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior și

▼M7

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale sunt adăugate la distribuția martorilor testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții. Baza de date privind martorii negativi testați anterior trebuie să fie solidă din punct de vedere statistic pentru a asigura capacitatea laboratorului de a evalua distribuția datelor sale privind martorii negativi. Referințele bibliografice sugerează că poate fi necesar un minim de 10 de experimente, dar ar trebui, de preferință, ca baza de date să fie constituită din cel puțin 20 experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X-bar (23)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectivul laborator. Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot constitui și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (24).

În cazul în care laboratorul nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor negativi solidă din punct de vedere statistic (a se vedea punctul 15) în timpul verificărilor de competență (descrise la punctul 13), se acceptă posibilitatea elaborării distribuției în timpul primelor teste de rutină. Această abordare trebuie să respecte recomandările stabilite în referințele bibliografice (24) și rezultatele martorilor negativi obținute în aceste experimente trebuie să rămână în conformitate cu datele publicate cu privire la martorii negativi.

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește impactul acesteia asupra datelor rezultate, care trebuie să fie în conformitate cu baza de date existentă privind martorii testați anterior a laboratorului. Doar inconsecvențele majore conduc la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior, în cazul în care opiniile experților stabilesc faptul că acestea diferă față de distribuția anterioară (a se vedea punctul 15). În timpul procesului de restabilire, o bază completă de date cu privire la martorii negativi nu este neapărat necesară pentru a permite efectuarea unui test propriu-zis, cu condiția ca laboratorul să poată demonstra că valorile martor negative ale acestuia rămân consecvente fie cu bazele de date anterioare aferente, fie cu datele publicate corespunzătoare.

Datele cu privire la martorii negativi trebuie să cuprindă incidența eritrocitelor micronucleate imature pentru fiecare animal. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale distribuției bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția de martori testați anterior în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 15) și nu există nicio dovadă de defecțiuni tehnice sau umane.

DESCRIEREA METODEI

Preparate

Selectarea speciilor de animale

Se utilizează șușe de laborator utilizate în mod curent, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. Se pot utiliza șoareci, șobolani sau la o altă specie de mamifere adecvată. Atunci când se utilizează sânge periferic, trebuie stabilit faptul că îndepărtarea splenică a celulelor micronucleate din circulație nu compromite detectarea micronucleelor induse la speciile selectate. Acest lucru a fost demonstrat în mod clar în cazul sângelui periferic de șoarece și șobolan (2). Justificarea științifică pentru utilizării altor specii decât șobolani și șoareci

▼M7

trebuie furnizată în raport. În cazul în care se utilizează alte specii decât rozătoare, se recomandă ca măsurarea micronucleelor induse să se integreze în alt test de toxicitate corespunzător.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință,70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a unei substanțe chimice de testat în cazul administrării prin această metodă. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci pentru fiecare cușcă), de același sex și grup supus tratamentului, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv, de preferință în cuști cu pardoseală solidă cu îmbogățire adecvată a mediului de viață. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

Se utilizează în mod normal animale adulte, tinere, sănătoase (pentru rozătoare, de preferință, de 6-10 săptămâni la începutul tratamentului, cu toate că animale puțin mai în vârstă sunt, de asemenea, acceptabile), care sunt distribuite în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, foarte puțin invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile trebuie dispuse astfel încât posibilele efecte datorate amplasării în cușcă să fie reduse la minim. Se evită contaminarea încrucișată dintre martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor trebuie să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Pregătirea dozelor

Substanțele de testat în stare solidă se dizolvă sau se pun în suspensii în solvenți sau vehicule corespunzătore sau se amestecă în alimente sau în apa de băut înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora. Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării și definesc condiții de stocare corespunzătoare.

Condiții de testare

Solvent/vehicul

Solventul/vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu trebuie să reacționeze chimic cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Exemple de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit includ apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori, care să ateste că niciun micronucleu sau efect vătămător nu este indus de către un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

▼M7

Controale

Martorii pozitivi

Pentru fiecare test se include, în mod normal, un grup de animale tratate cu o substanță chimică martor pozitivă. Acest lucru poate fi eliminat în cazul în care laboratorul de testare a demonstrat competență în efectuarea testului și a stabilit un interval de martori pozitivi testați anterior. În cazul în care un grup de martori pozitivi testați în paralel nu este inclus, în fiecare experiment se includ martori examinați (lame fixate și necolorate sau probe de suspensie celulară, în funcție de metoda de examinare). Acestea pot fi obținute prin includerea în sistemul de examinare a studiului de probe de referință adecvate care au fost obținute și păstrate în urma unui experiment separat cu martori pozitivi efectuat periodic (de exemplu, la fiecare 6-18 luni), de exemplu, în timpul testărilor de competență și ulterior în mod regulat, dacă este necesar.

Substanțele chimice martor pozitive trebuie să producă în mod fiabil o creștere detectabilă în ceea ce privește frecvența micronucleelor față de nivelul spontan. Atunci când se utilizează examinarea manuală prin microscopie, dozele de martor pozitiv se aleg astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinatorului identitatea probelor codate. Pentru martorul pozitiv, se poate accepta administrarea pe o cale diferită față de cea utilizată în cazul substanței chimice de testat, folosind o schemă de tratament diferită și o singură prelevare de probe. În plus, utilizarea de martori pozitivi din aceeași clasă de substanțe chimice poate fi luate în considerare, după caz. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Tabelul 1

Exemple de substanțe chimice martor pozitive.

Substanțe chimice și Nr. CAS
Metansulfonat de etil [NR. CAS 62-50-0]
Metansulfonat de metil [NR. CAS 66-27-3]
Etil nitrozouree [NR. CAS 759-73-9]
Mitomicină C [NR. CAS 50-07-7]
Ciclofosfamidă (monohidrat) [NR. CAS 50-18-0 (NR. CAS 6055-19-2)]
Trietilenmelamină [NR. CAS 51-18-3]
Colchicină [NR. CAS 64-86-8] sau vinblastină [NR. CAS 865-21-4] – ca aneugeni

Martorii negativi

Animalele din grupul martor negativ se iau în considerare la fiecare prelevare de probe și se manipulează de altfel în același mod precum grupurile tratate, cu excepția faptului că nu beneficiază de tratamentul cu substanța chimică de testat. În cazul în care un solvent/vehicul este utilizat pentru administrarea substanței chimice de testat, acesta se administrează grupului martor. Cu toate acestea, în cazul în care coerența variabilității inter-animale și frecvențele celulelor cu micronuclee sunt demonstrate de datele privind martorii negativi testați anterior la fiecare prelevare de probe efectuată de către laboratorul de testare, ar putea fi necesară o singură prelevare de probe pentru martorul negativ. În cazul în care se utilizează o singură prelevare de probe pentru martorii negativi, aceasta trebuie să fie prima prelevare de probe utilizată în cadrul studiului.

▼M7

În cazul în care se utilizează sânge periferic, se acceptă o probă prelevată înainte de tratament în locul unui martor negativ testat în paralel pentru studiile pe termen scurt, atunci când datele rezultate sunt coerente cu baza de date privind martorii testați anterior a laboratorului de testare. În cazul șobolanilor, s-a demonstrat că prelevarea de probe de volume mici (de exemplu, sub 100 µl/zi) înainte de tratament are un impact minim asupra frecvenței de fond a micronucleelor (25).

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

În general, reacția de micronucleu este similară între masculi și femele, prin urmare, majoritatea studiilor ar putea fi efectuate pe oricare dintre sexe (26). Datele care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate, toxicitate în măduva osoasă, etc., inclusiv, de exemplu, într-un studiu de stabilire a dozelor) ar încuraja utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu în cazul ambelor sexe, de exemplu, ca parte a unui studiu de toxicitate cu doză repetată. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care sunt utilizate ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modalitatea de analiză a datelor care utilizează acest model.

Dimensiunea grupurilor la începutul studiului se stabilește cu scopul de a furniza pentru fiecare grup cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex în cazul în care ambele sexe sunt utilizate. În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează pe sexul corespunzător. Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu pe măduva osoasă efectuat în conformitate cu parametrii stabiliți la punctul 37, cu trei grupuri de dozare și martori negativi și pozitivi testați în paralel (fiecare grup alcătuit din cinci animale de același sex) ar necesita între 25 și 35 de animale.

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se realizează în același laborator, utilizând aceeași specie, șușă, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (27). Studiul are ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită drept doza cea mai ridicată care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, cu reducerea greutății corporale sau a citotoxicității sistemului hematopoietic, dar nu deces sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere în condiții umane (28)].

Doza maximă poate fi definită, de asemenea, ca doza care produce toxicitate în măduva osoasă (de exemplu, o reducere a proporției de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite din măduva osoasă sau din sângele periferic de mai mult de 50 %, dar nu mai puțin de 20 % din valoarea probei martor). Cu toate acestea, atunci când sunt analizate celulele CD71 pozitiv în circulația periferică a sângelui (și anume, prin citometria de flux), această fracție foarte tânără de eritrocite imature răspunde mai repede provocărilor toxice decât cohorta mai mare de eritrocite imature cu ARN pozitiv. Prin urmare, toxicitatea aparent mai mare ar putea fi evidentă prin modelele de expunere acută care examinează fracția CD71 pozitivă de eritrocite imature în raport cu cele care identifică eritrocite imature pe baza conținutului de ARN. Din acest motiv, atunci când se utilizează experimente de cinci sau mai puține zile de tratament, doza cea mai ridicată pentru substanțele chimice de testat care provoacă toxicitate poate fi definită ca doza care provoacă o reducere semnificativă din punct de vedere statistic a proporției de eritrocite imature CD71 pozitiv în raport cu numărul total de eritrocite, dar nu la mai puțin de 5 % din valoarea probei martor (29).

▼M7

Substanțele chimice care prezintă saturație a proprietăților toxicocinetice sau provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după un tratament pe termen lung pot reprezenta excepții de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ și un minim de trei niveluri de doze separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o perioadă de administrare de 14 zile sau mai mult este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau pentru perioade de administrare mai mici de 14 zile, 2 000 mg/kg greutate corporală/zi. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT trebuie să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate trebuie, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (măduva osoasă) la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au ca scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot necesita grupuri suplimentare de dozare. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia.

Test-limită

În cazul în care experimentele pentru stabilirea intervalului sau datele existente legate de șușele de animale indică faptul că un regim de tratament de cel puțin o doza limită (descrisă mai jos) nu produce efecte toxice detectabile (inclusiv nicio diminuare a proliferării măduvei osoase sau alte semne de citotoxicitate în țesutul țintă) și în cazul în care o genotoxicitate este improbabilă pe baza studiilor *in vitro* de genotoxicitate sau datelor provenite de la substanțele chimice cu o structura apropriată, este posibil ca un studiu integral cu trei niveluri de doze diferite să nu fie considerat necesar dacă s-a demonstrat că substanța (substanțele) chimică(e) de testat ajunge (ajung) la țesutul țintă (măduva osoasă). În astfel de cazuri, un singur nivel de doză, la doza limită, poate fi suficient. În cazul în care administrarea se realizează timp de 14 zile sau mai mult, doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru administrarea cu o durată mai mică de 14 zile, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese, după caz. În orice caz, calea se alege pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în general, deoarece nu este o cale destinată expunerii umane și se utilizează doar cu justificări științifice specifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și prelevarea de probe, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctul 37). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se poate administra un maxim de 2 ml/100 g. Utilizarea unor volume mai mari decât cele menționate trebuie să fie justificată. Exceptând substanțele chimice de testat iritante sau corozive, care vor prezenta, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat se reduce la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure administrarea unui volum constant în raport cu greutatea corporală pentru toate dozele.

▼M7

Schema de tratament

De preferință, se efectuează 2 sau mai multe tratamente, administrate la intervale de 24 de ore, în special la integrarea acestui test în alte studii de toxicitate. Cu titlu subsidiar, pot fi administrate tratamente unice, dacă se justifică științific (de exemplu, substanțe chimice de testat despre care se știe că blochează ciclul celular). Substanțele chimice de testat se pot administra, de asemenea, în doză fracționată, și anume, două sau mai multe tratamente în aceeași zi, la distanță de nu mai mult de 2-3 ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste circumstanțe sau atunci când substanța chimică de testat este administrată prin inhalare, momentul pentru prelevarea de probe trebuie programat în funcție de ultima administrare a dozei sau de sfârșitul expunerii.

Testul poate fi efectuat la șoareci sau șobolani prin una dintre următoarele trei metode:

a. Animalele se tratează cu substanța chimică de testat o singură dată. Probele de măduvă osoasă se prelevează de cel puțin două ori (de la grupuri independente de animale), nu mai devreme de 24 de ore după tratament, fără să se prelungească mai mult de 48 de ore după tratament, cu interval (intervalee) corespunzător (corespunzătoare) între probe, cu excepția cazului în care o substanță chimică de testat este cunoscută ca având un timp de înjumătățire excepțional de lung. Prelevarea de probe mai devreme de 24 de ore după tratament trebuie justificată. Probele de sânge periferic se prelevează cel puțin de două ori (de la același grup de animale), începând nu mai devreme de 36 de ore după tratament, la un interval corespunzător (la intervale corespunzătoare) după prima probă, fără să se depășească 72 de ore. După prima prelevare de probe, se tratează toate grupurile de dozare și se colectează probele pentru analiză; cu toate acestea, la ultima (ultimele) prelevare (prelevări) de probe se administrează doar dozele maxime. În cazul în care se constată o reacție pozitivă la un moment de prelevare, prelevarea suplimentară de probe nu este necesară, cu excepția cazului în care sunt necesare informații cantitative doză-răspuns. Timpii de recoltă descriși mai sus sunt o consecință a cineticii apariției și dispariției micronucleelor în cele 2 straturi de țesuturi.

b. În cazul în care sunt utilizate două tratamente zilnice (de exemplu, două tratamente la intervale de 24 de ore), probele se prelevează o singură dată între 18 și 24 de ore după tratamentul final pentru măduva osoasă sau o singură dată între 36 și 48 de ore după tratamentul final pentru sângele periferic (30).Timpii de recoltă descriși mai sus sunt o consecință a cineticii apariției și dispariției micronucleelor în cele 2 straturi de țesuturi.

c. În cazul în care se utilizează trei sau mai multe tratamente zilnice (de exemplu, trei sau mai multe tratamente la intervale de aproximativ 24 de ore), probele de măduvă osoasă se prelevează nu mai târziu de cel mult 24 de ore de la ultimul tratament, iar sângele periferic se prelevează nu mai târziu de 40 de ore de la ultimul tratament (31).Această opțiune de tratament permite combinația dintre testul Comet (de exemplu, prelevarea de probe 2-6 de ore de la ultimul tratament) și testul de micronucleu și integrarea testului de micronucleu în studiile de toxicitate cu doză repetată. Datele acumulate sugerează faptul că inducția de micronuclee poate fi observată în aceste intervale de timp mai mari atunci când au fost efectuate 3 sau mai multe administrări (15).

Alte regime de dozare sau de prelevare pot fi utilizate atunci când este relevant și se justifică din punct de vedere științific, precum și pentru a facilita integrarea cu alte teste de toxicitate.

Observații

Se recomandă efectuarea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, se examinează toate animalele cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Se cântăresc toate animalele la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doze repetate și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, se măsoară consumul de hrană cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de

▼M7

testat este administrată prin apa de băut, se măsoară consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasiază înaintea de încheierea perioadei de testare (28). În anumite circumstanțe, temperatura corpului animalelor ar putea fi monitorizată, având în vedere faptul că hipertermia și hipotermia provocată de tratament au fost implicate în producerea de rezultate false (32) (33) (34).

Expunere țesutului țintă

Se prelevează o probă de sânge la momentul (momentele) adecvat(e) pentru a permite investigarea nivelurilor plasmatice ale substanțelor chimice de testat cu scopul de a demonstra faptul că măduva osoasă a fost expusă, acolo unde este cazul și unde nu există alte date de expunere (a se vedea punctul 48).

Prepararea măduvei osoase/a sângelui

Celule de măduvă osoasă se obțin în mod obișnuit din femurul sau tibia animalelor imediat după eutanasierea în condiții umane. De regulă, celulele se extrag, se depun pe lame și se colorează prin metodele stabilite. Cantități mici de sânge periferic pot fi obținute în conformitate cu standardele de bunăstare animală adecvate, folosind fie o metodă care să permită supraviețuirea animalelor de experiență precum sângerarea din vena caudală sau alte vase de sânge corespunzătoare, fie prin puncție cardiacă sau prelevarea de probe de la un vas mare la eutanasierea animalului. Atât pentru eritrocitele derivate din măduva osoasă, cât și pentru cele derivate din sânge periferic, în funcție de metoda de analiză, celulele pot fi colorate imediat supravital (16) (17) (18), pot fi întinse pe lame și apoi colorate pentru microscopie sau pot fi fixate și colorate în mod adecvat pentru citometria de flux. Utilizarea unui colorant specific pentru ADN [de exemplu, oranj de acridină (35) sau Hoechst 33258 plus pironină-Y (36)] poate să elimine unele dintre artefactele asociate utilizării unui colorant nespecific pentru ADN. Avantajul menționat nu exclude utilizarea coloranților convenționali (de exemplu, Giemsa pentru analiza microscopică). Se pot utiliza și alte sisteme [de exemplu, coloane de celuloză pentru eliminarea celulelor nucleate (37) (38)], cu condiția ca sistemele respective să se fi dovedit compatibile cu pregătirea probelor în laborator.

În cazul în care aceste metode sunt aplicabile (39), anticorpii antikinetocori, metoda FISH cu sonde ADN pancentromerice (40) sau marcarea *in situ* cu ajutorul amorselor pancentrometrice, împreună cu un colorant de contrast al ADN adecvat (41) pot fi utilizați pentru a identifica natura micronucleelor (cromozomi/fragmente cromozomiale) pentru a stabili dacă mecanismul inducției de micronuclee se datorează activității clastogene și/sau aneugene. Alte metode de diferențiere a efectelor clastogene și aneugene pot fi utilizate, cu condiția ca eficacitatea acestora să fi fost demonstrată.

Analiză (manuală și automată)

Toate lamele sau probele pentru analiză, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, se codifică în mod independent înainte de orice tip de analiză și se randomizează astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament; o astfel de codificare nu este necesară atunci când se utilizează sisteme automate de examinare care nu se bazează pe inspecție vizuală și nu pot fi afectate de subiectivitatea operatorului. Pentru fiecare animal se determină proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite (imature + mature) prin examinarea a cel puțin 500 de eritrocite pentru măduva osoasă și 2 000 de eritrocite pentru sângele periferic (42). Cel puțin 4 000 de eritrocite imature se analizează per animal pentru a determina incidența eritrocitelor imature micronucleate (43). În cazul în care datele cu privire la martorii negativi testați anterior indică faptul că valoarea medie a frecvenței de fond de eritrocite imature micronucleate este < 0,1 % în laboratorul de testare, se ia în considerare examinarea de

▼M7

celule suplimentare. Atunci când se analizează probe, proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite de la animalele tratate nu trebuie să fie mai mică de 20 % din proporția martorului tratat cu vehicul/solvent la examinarea prin microscopie și mai mică decât aproximativ 5 % din proporția martorului tratat cu vehicul/solvent la examinarea de eritrocite imature CD71+ prin metode citometrice (a se vedea punctul 31) (29).De exemplu, pentru un test de măduvă osoasă examinat prin microscopie, în cazul în care proporția de probă martor de eritrocite imature în măduva osoasă este de 50 %, limita superioară de toxicitate ar fi de 10 % eritrocite imature.

Deoarece splina de șobolan sechestrează și distruge eritrocitele micronucleate, pentru a menține un nivel ridicat de sensibilitate a testului atunci când se analizează sânge periferic de șobolan, este preferabil să se limiteze analiza eritrocitelor imature micronucleate la cea mai tânără fracție. Atunci când se utilizează metode de analiză automată, aceste eritrocite imature pot fi identificate pe baza conținutului lor ridicat de ARN sau pe baza nivelului ridicat de receptori de transferină (CD71+) exprimat pe suprafața acestora (31). Cu toate acestea, comparația directă a diferitelor metode de colorare a arătat că se pot obține rezultate satisfăcătoare prin diferite metode, inclusiv colorarea convențională cu oranj de acridină (3) (4).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se recomandă prezentarea sub formă de tabel a datelor pentru fiecare animal. Pentru fiecare animal, se consemnează în mod separat numărul de eritrocite imature examinate, numărul de eritrocite imature micronucleate și numărul de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite. Atunci când șoarecii se tratează în mod continuu timp de 4 săptămâni sau mai mult, se prezintă, de asemenea, datele privind numărul și proporția de eritrocite mature micronucleate, dacă au fost colectate. Datele cu privire la toxicitatea animală și semnele clinice trebuie, de asemenea, să fie raportate.

Criterii de acceptabilitate

Următoarele criterii determină acceptabilitatea testului:

a. Datele privind martorii negativi testați în paralel sunt considerate acceptabile pentru adăugarea la baza de date cu privire la martorii testați anterior (a se vedea punctele 1518).

b. Martorii pozitivi testați în paralel sau martorii examinați trebuie să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date cu privire la martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 24-25).

c. Un numărul corespunzător de doze și celule a fost analizat.

d. Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctele 30-33.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar pozitivă în cazul în care:

a. Cel puțin unul dintre grupurile tratate prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței de eritrocite imature micronucleate, comparativ cu martorul negativ testat în paralel,

b. Această creștere este raportată la doză cel puțin la un moment de prelevare de probe atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței și

c. Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson).

▼M7

În cazul în care se analizează doar doza maximă la un anumit moment de prelevare de probe, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar pozitivă în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ testat în paralel, iar rezultatele se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control 95 % pe baza distribuției Poisson). Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (44) (45) (46) (47). La efectuarea unei analize a relației doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri tratate de dozare. Testele statistice utilizează animalul ca unitate experimentală. Rezultatele pozitive ale testului de micronucleu indică faptul că substanța chimică de testat determină formarea de micronuclee ca urmare a leziunilor cromozomiale sau leziunilor aparatului mitotic din eritroblaștii speciei testate. În cazul în care s-a efectuat un test pentru depistarea centromerelor în micronuclee, o substanță chimică de testat ce produce micronuclee care conțin centromer (ADN centromeric sau kinetocor, indicând pierdere de cromozomi întregi) reprezintă dovada că substanța chimică de testat este un aneugen.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativ dacă, în toate condițiile experimentale examinate:

a. Niciunul dintre grupurile tratate nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a frecvenței eritrocitelor imature micronucleate în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b. Nu există nicio creștere raportată la doză indiferent de momentul prelevării, atunci când este evaluată prin intermediul unui test adecvat de stabilire a tendinței,

c. Toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson) și

d. Măduva osoasă a fost expusă la substanța (substanțele) chimică(e) de testat.

Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (44) (45) (46) (47). Dovezi ale expunerii măduvei osoase la o substanță chimică de testat pot include o diminuare a raportului dintre eritrocitele imature față de eritrocitele mature sau măsurarea concentrațiilor plasmatice sau sangvine din substanța chimică de testat. În cazul administrării intravenoase, nu sunt necesare dovezi de expunere. În mod alternativ, datele ADME, obținute în cadrul unui studiu independent utilizând aceeași cale și aceeași specie, pot fi utilizate pentru a demonstra expunerea măduvei osoase. Rezultatele negative indică faptul că, în condițiile de testare, substanța chimică de testat nu produce micronuclee în eritrocitele imature ale speciei de testat.

În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a acorda asistență în stabilirea relevanței biologice a rezultatului (de exemplu, o creștere slabă sau de limită), datele se evaluează de către experți și/sau prin investigații suplimentare realizate pe experimentele existente. În unele cazuri, analizarea mai multor celule sau repetarea experimentului utilizând condițiile experimentale modificate ar putea fi utile.

În cazuri rare, inclusiv după efectuarea de investigații suplimentare, datele vor exclude posibilitatea unui rezultat pozitiv sau negativ al substanței chimice de testat și, prin urmare, studiul va fi concluzionat ca fiind echivoc.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Rezumat

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

▼M7

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

— aspect fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— caracterizată în măsura în care este posibil prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animalele de experiență:

— specia/șușă utilizată și justificarea utilizării;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metodă de identificare unică a animalelor;

— pentru studiile pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului; pentru studiile mai lungi de o săptămână: greutatea corporală a fiecărui animal pe durata studiului și consumul de hrană. Se includ intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condițiile de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

— datele din studiul de stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;

— justificarea alegerii nivelului dozei administrate;

— detaliile privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;

— justificarea căii și a duratei de administrare;

— metodele de verificare pentru a constata dacă substanța (substanțele) chimică(e) de testat a (au) ajuns în circulația generală sau în țesutul țintă;

▼M7

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) și în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— metoda de eutanasiere;

— metoda de analgezie (atunci când se utilizează);

— descrierea amănunțită a schemelor de tratare și de prelevare a probelor și justificările alegerilor;

— metodele de preparare a lamelor;

— proceduri pentru izolarea și conservarea probelor;

— metodele de măsurare a toxicității;

— criteriile pentru examinarea eritrocitelor imature micronucleate;

— numărul de celule analizate per animal pentru a determina frecvența eritrocitelor imature micronucleate și pentru a determina proporția de eritrocite imature în raport cu eritrocitele mature;

— criterii de acceptabilitate a studiului;

— metode precum utilizarea de anticorpi antikinetocori sau probe ADN cu centromere specifice pentru a determina dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau fragmentați, dacă se aplică.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata testului, inclusiv semne de toxicitate;

— proporția de eritrocite imature în raport cu numărul total de eritrocite;

— numărul de eritrocite imature micronucleate, prezentat separat pentru fiecare animal;

— valoarea medie ± deviația standard pentru eritrocitele imature micronucleate pentru fiecare grup;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— analizele statistice și metodele aplicate;

— date privind martorii pozitivi și negativi testați în paralel, cu intervale, valori medii și deviații standard;

— date cu privire la martorii negativi și pozitivi testați anterior cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și perioada de timp acoperită și numărul de puncte de date;

— date care să demonstreze că măduva osoasă a fost expusă;

— date de caracterizare indicând dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau fragmentați, dacă se aplică;

— criterii îndeplinite pentru un răspuns pozitiv sau negativ.

▼**M7**

Discutarea rezultatelor.

Concluzie.

Referințe.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD(2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, p. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, p. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, p. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, p. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, p. 65-73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, p. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, p. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, p. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, p. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, p. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, p. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, p. 555-558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, p. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, p. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, p. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/23, p. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, p. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, p. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, p. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, p. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, p. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, p. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, p. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, p. 313-319.

▼**M7**

(28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, p. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, p. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, p. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, p. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, p. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, p. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, p. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, p. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, p. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, p. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, p. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, p. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, p. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, p. 97-99.

(43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays", în Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays", în Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, p. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, p. 233-241.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Centromer: Regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eritoblast: Un stadiu incipient de dezvoltare a eritrocitelor, care precede imediat eritrocitele imature, în cazul în care celula conține încă un nucleu.

Kinetocor: Structură proteică ce se formează pe centromerul celulelor eucariote, care leagă cromozomul de polimerii microtubulilor din fusul mitotic în timpul mitozei și meiozei și funcționează în timpul diviziunii celulare pentru a separa cromatidele surori.

Micronuclee: Nuclee mici, separate de nucleele principale ale celulelor și prezente în plus față de acestea, produse în timpul telofazei mitozei (meioză) de către fragmentele de cromozomi sau de cromozomii întregi întârziați.

Eritrocit monocromatic sau matur: Un eritrocit complet matur care a pierdut ARN-ul rezidual rămas în urma cariolizei și/sau care a pierdut markerii celulari cu durată scurtă de viață care dispar în mod caracteristic după carioliza ce urmează după diviziunea finală a eritroblastului.

Eritrocit policromatic sau imatur: Un eritrocit nou-format într-un stadiu intermediar de dezvoltare care se colorează atât cu componentele albastre, cât și cu cele roșii ale coloraței clasice a sângelui precum coloranța Wright Giemsa datorită prezenței ARN-ului rezidual în celula nou-formată. Aceste celule nou-formate sunt aproximativ identice cu reticulocitele, care sunt vizualizate utilizând o colorație vitală ce cauzează ca ARN-ul rezidual să se aglutineze într-un reticul. Alte metode, inclusiv coloranța monocromatică de ARN cu coloranți fluorescenți sau etichetarea markerilor de suprafață cu o durată de viață scurtă precum CD71 cu anticorpi fluorescenți sunt utilizate frecvent în prezent pentru a identifica celula roșie nou-formată. Eritrocitele policromatice, reticulocitele și eritrocitele CD71 pozitiv sunt toate eritrocite imature, cu toate că fiecare dintre acestea are o distribuție ușor diferită a vârstei.

Reticulocit: Un eritrocit nou-format, colorat cu o colorație vitală, ce cauzează ca ARN-ul rezidual celular să se aglutineze într-un reticul caracteristic. Reticulocitele și eritrocitele policromatice au o distribuție a vârstei celulare asemănătoare.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testate utilizând această metodă de testare.

▼M7

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL PENTRU IDENTIFICAREA DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL *IN VIVO* DE MICRONUCLEU

Modelul factorial și analiza acestuia

În acest model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Acest model, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a variației, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea setului de date în cea dintre sexe, cea dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității între animalele replică în cadrul grupelor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a concentrației sexului x în tabelul ANOVA ([1]). În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratice ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă a concentrației sexului x, această condiție poate fi împărțită, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru nivelurile diferite de concentrație, precum cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor la aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de „concepere a experimentelor”. În continuare este prezentată o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple de modele comparabile, în unele cazuri cu codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

([1]) Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul anova tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor, dezvoltate în epoca de dinaintea computerului.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAGENITATEA – TESTUL DE MUTAȚIE INVERSĂ PE BACTERII**

1. **METODĂ**

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 471 a OCDE, Testul de mutație inversă pe bacterii (1997).

1.1. INTRODUCERE

Testul bacterian de mutație inversă se bazează pe suşe de *Salmonella typhimurium* şi *Escherichia coli,* care necesită aminoacizi, şi urmăreşte detectarea mutațiilor punctiforme, care includ substituția, adăugarea sau deleția uneia sau a câtorva perechi de bază din ADN (1) (2) (3). Principiul prezentului test bacterian de mutație inversă constă în detectarea mutațiilor care reîntorc mutațiile, prezente în suşele experimentale, în starea inițială şi refac funcționalitatea bacteriilor de a sintetiza un aminoacid esențial. Bacteriile de inversare se detectează datorită capacității lor de a se dezvolta în absența aminoacidului necesar pentru suşa parentală experimentală.

Mutațiile punctiforme sunt cauza multor maladii genetice umane şi există dovezi substanțiale că mutațiile din oncogene şi genele supresoare de tumori din celulele somatice sunt implicate în formarea tumorilor la oameni şi animalele de laborator. Testul bacterian de mutație inversă este rapid, ieftin şi relativ uşor de realizat. Multe dintre suşele experimentale au câteva particularități care le fac mai sensibile pentru detectarea de mutații, inclusiv secvențe de ADN sensibile la mutații în locurile de inversare, permeabilitate celulară crescută pentru moleculele mari şi eliminarea sistemelor de regenerare a ADN sau intensificarea proceselor care au tendința să inducă erori în timpul regenerării ADN. Specificitatea suşelor experimentale poate să furnizeze informații utile privind tipurile de mutații care sunt induse de către agenții genotoxici. O bază de date cu un număr mare de rezultate, pentru structuri foarte variate, este disponibilă pentru testele bacteriene de mutații inverse şi au fost elaborate metodologii bine stabilite pentru testarea produselor chimice cu diferite proprietăți fizico-chimice, inclusiv a compuşilor volatili.

A se vedea introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

Un test de mutație inversă, fie la *Salmonella typhimurium,* fie la *Escherichia coli,* detectează mutația într-o suşă care necesită un aminoacid (histidină sau respectiv triptofan) pentru a produce o suşă independentă de aportul exterior de aminoacid.

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază sunt agenți care provoacă substituirea unei baze din ADN. Într-un test de reversie, acest tip de modificare poate să se producă la locul mutației inițiale sau într-un al doilea loc în genomul bacterian.

Mutageni de decalare a cadrului de citire sunt agenți care produc adăugarea sau deleția uneia sau a mai multor perechi de bază din ADN, modificând astfel cadrul de citire în ARN.

▼B

1.3. CONSIDERAȚII PRELIMINARE

Testul bacterian de mutație inversă utilizează celule procariote, care diferă de celulele mamiferelor în privința absorbției, a metabolismului, a structurii cromozomilor și a proceselor de regenerare a ADN. Pentru testele realizate *in vitro* este necesară în general o sursă exogenă de activare metabolică. Sistemele de activare metabolică i*n vitro* nu pot să reproducă în totalitate condițiile metabolismului celulelor de mamifere *in vivo*. Testul nu furnizează, prin urmare, informații directe privind capacitatea mutagenă și cancerigenă a unei substanțe la mamifere.

Testul bacterian de mutație inversă se utilizează, de obicei, pentru o primă triere a activității genotoxice, în special pentru detectarea mutației punctiforme. O bogată bază de date demonstrează că multe produse chimice care dau rezultate pozitive în prezentul test prezintă activitate mutagenă și în alte teste. Există exemple de agenți mutageni care nu se detectează prin acest test; aceste deficiențe se pot explica prin natura specifică a efectului detectat, activării metabolice diferite sau biodisponibilității diferite. Pe de altă parte, factorii care cresc sensibilitatea testului bacterian de mutație inversă pot să conducă la o supraestimare a activității mutagene.

S-ar putea ca testul bacterian de mutație inversă să nu fie potrivit pentru evaluarea anumitor clase de substanțe chimice, de exemplu compușii cu acțiune bactericidă puternică (de exemplu anumite antibiotice) sau cei despre care se consideră (sau se știe) că interferează în mod specific cu sistemele de replicare a celulelor de mamifere (de exemplu unii inhibitori de topoizomerază și unii analogi de nucleozide). În aceste cazuri, s-ar putea ca testele de mutație pe celule de mamifere să fie mai potrivite.

Deși mulți compuși care dau rezultate pozitive în prezentul test sunt cancerigene pentru mamifere, corelația nu este absolută. Aceasta depinde de clasa de substanțe chimice și există agenți cancerigeni care nu se detectează cu prezentul test, deoarece acționează prin alte mecanisme negenotoxice sau mecanisme care nu sunt prezente în celulele bacteriene.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Suspensiile de celule bacteriene sunt expuse la substanța de testat în prezența și în absența unui sistem exogen de activare metabolică. În procedeul de încorporare prin depunere pe o placă, suspensiile menționate se amestecă cu o geloză de acoperire (agar) și se depun imediat pe un mediu minimal. În procedeul cu preincubare, amestecul de tratare se incubează și apoi se amestecă cu geloza de acoperire înaintea depunerii pe un mediu minim. Pentru ambele metode, după două sau trei zile de incubare, coloniile care produc inversarea se numără și numărul obținut se compară cu cel al coloniilor spontane de inversare aflate pe plăci cu martor tratate cu solvent.

Sunt descrise câteva proceduri pentru realizarea testului bacterian de mutație inversă. Printre cele utilizate în mod curent sunt metoda de încorporare prin depunere (1) (2) (3) (4), metoda cu preincubare (2) (3) (5) (6) (7) (8), metoda fluctuației (9) (10) și metoda cu suspensie (11). Sunt descrise modificări pentru testarea substanțelor în stare gazoasă sau de vapori (12).

▼B

În prezenta metodă se descrie modul de lucru pentru procedeul de încorporare prin depunere și pentru cel cu preincubare. Oricare dintre acestea se poate accepta pentru realizarea experimentelor, atât cu activare metabolică, cât și fără aceasta. Pentru unele substanțe, este mai eficientă detectarea prin procedeul cu preincubare. Substanțele respective aparțin unor clase chimice care includ nitrozamine alifatice cu lanț scurt, metale bivalente, aldehide, coloranți azoici și diazoderivații, alcaloizi ai pirolizidinei, compuși alchilici și nitroderivați (3). De asemenea, se admite că unele clase de mutageni nu se detectează întotdeauna prin procedee standard, ca încorporarea prin depunere sau procedeul cu incubare. Ar trebui să se considere că acestea sunt „cazuri izolate” și se recomandă cu tărie utilizarea unor procedee alternative pentru detectarea lor. Din categoria „cazuri izolate” este posibilă identificarea (împreună cu exemple de procedeele care se pot utiliza pentru detectarea acestora) a următoarelor cazuri: coloranți azoici și compuși diazoici (3) (5) (6) (13), cei în stare gazoasă și volatili (12) (14) (15) (16) și glicozidele (17) (18). Orice deviație de la procedura standard necesită o justificare științifică.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Pregătire**

1.5.1.1. *Bacteriile*

Culturile proaspete de bacterii ar trebui lăsate să se dezvolte până la finalul fazei exponențiale sau debutul fazei staționare de creștere (aproximativ 10^9 celule pe ml). Culturile aflate în faza staționară finală nu ar trebui să se utilizeze. Este esențial ca în experiment să se utilizeze culturi cu titru mare de bacterii viabile. Titrul se poate determina, fie plecând de la datele anterioare privind curbele de creștere ale culturilor martor, fie pentru fiecare test, prin determinarea numărului de celule viabile prin etalare.

Temperatura de incubare recomandată este de 37 °C.

Se recomandă utilizarea a minimum cinci sușe de bacterii. Acestea ar trebui să includă patru sușe de *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 sau TA97a sau TA97; TA98 și TA100) pentru care comparațiile între laboratoare au indicat că sunt fiabile și dau răspunsuri reproductibile. Cele patru sușe de *S. typhimurium* menționate posedă perechi de bază GC în primul situs de reversie și se cunoaște că acestea nu pot să detecteze anumiți agenți mutageni oxidanți, agenți de reticulare și unele hidrazine. Detectarea acestor substanțe este posibilă cu ajutorul sușelor de *E. coli* WP2 sau de *S. typhimurium* TA102 (19) care posedă o pereche de bază AT în situsul primar de reversie. Combinația de sușe recomandată este, prin urmare, următoarea:

— *S.* typhimurium TA1535; și

— *S. typhimurium* TA1537 sau TA97 sau TA97a; și

— S. typhimurium TA98; și

— S. typhimurium TA100; și

— *E. coli* WP2 uvrA sau *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) sau *S. typhimurium* TA102.

Pentru detectarea agenților mutageni de reticulare s-ar putea prefera includerea sușei TA102 sau adăugarea unei sușe de *E. coli* capabile de regenerarea ADN [de exemplu *E. coli* WP2 sau *E. coli* WP2 (pKM101)].

▼B

Ar trebui să se utilizeze procedurile stabilite pentru prepararea culturilor de rezervă, verificarea markerilor și pentru păstrare. Pentru fiecare preparat de cultură de rezervă congelată, ar trebui să se demonstreze necesitatea prezenței unui aminoacid pentru dezvoltarea culturii (histidină pentru sușele *S. typhimurium* și triptofan pentru sușele *E. coli*). Ar trebui să se verifice și alte caracteristici ale fenotipului, de exemplu: prezența sau absența plasmidelor factorului R (rezistență), dacă este cazul [și anume rezistența la ampicilină a sușelor TA98, TA100, TA97a sau TA97, WP2 uvrA și WP2 uvrA (pKM101) și rezistența la ampicilină + tetraciclină a sușei TA102]; prezența mutațiilor caracteristice (și anume mutația rfa în *S. typhimurium* prin sensibilizare la cristal violet și mutația uvrA în *E. coli* sau mutația uvrB în *S. typhimurium* prin sensibilizare la lumina ultravioletă) (2) (3). De asemenea, sușele ar trebui să producă un număr de colonii spontane de reversie pe fiecare placă, între limitele de frecvență estimate pe baza datelor de laborator anterioare și, de preferință, între limitele semnalate în literatura de specialitate.

1.5.1.2. *Mediul*

Se utilizează o geloză minimală corespunzătoare (de exemplu una care conține mediu minimal E Vogel-Bonner și glucoză) și o geloză de acoperire care conține histidină și biotin sau triptofan pentru a permite divizarea doar a unui număr mic de celule (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activarea metabolică*

Expunerea bacteriilor la substanța de testat ar trebui să se realizeze atât în prezența, cât și în absența unui sistem corespunzător de activare metabolică. Sistemul utilizat cel mai frecvent conține o fracție post mitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9), preparată din ficat de rozătoare tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (1) (2) sau un amestec de fenobarbitonă și β-naftoflavonă (18) (20) (21). Fracția postmitocondrială se utilizează, de obicei, la concentrații cuprinse între 5 și 30 % v/v în amestecul S9. Alegerea și compoziția unui sistem de activare metabolică pot să depindă de clasa chimică a substanței de testat. În unele cazuri, s-ar putea să fie convenabilă utilizarea mai multor concentrații ale fracției postmitocondriale. Pentru coloranții azoici și diazoderivați, s-ar putea să fie mai potrivită utilizarea unui sistem de activare metabolică reducător (6) (13).

1.5.1.4. *Substanța de testat/Preparare*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se prepare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare, care, dacă este cazul, se diluează înaintea tratamentului bacteriilor. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în sistemele de testare și se diluează înainte de utilizare în tratamentul bacteriilor. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

Solventul/vehiculul nu ar trebui să reacționeze chimic cu substanța de testat și nu ar trebui să afecteze supraviețuirea bacteriilor și activitatea S9 (22). Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos. Când se testează substanțe instabile în apă, solventul organic utilizat ar trebui să nu conțină apă.

▼B

1.5.2. **Condiții de testare**

1.5.2.1. *Suşele experimentale (a se vedea 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentrația de expunere*

Printre criteriile care trebuie luate în considerație la determinarea cantității maxime de substanță de testat ce urmează se utilizeze sunt citotoxicitatea și solubilitatea în amestecul final de tratare.

Ar putea fi util un test preliminar pentru determinarea toxicității şi caracteristicilor de solubilitate. Detectarea citotoxicității poate fi posibilă printr-o reducere a numărului de colonii care provoacă reversia, o clarificare și diminuare a fondului de bacterii sau a gradului de supraviețuire a culturilor tratate. Prezența sistemelor de activare metabolică poate să influențeze citotoxicitatea unei substanțe. Insolubilitatea ar trebui să fie evaluată prin formarea în amestecul final, în condiții de testare reale, a unui precipitat vizibil cu ochiul liber.

Concentrația de testare maximă recomandată pentru substanțele necitotoxice solubile este de 5 mg/placă sau 5 µl/placă. Pentru substanțele necitotoxice insolubile la 5 mg/placă sau 5 µl/placă, una sau mai multe din concentrațiile de testare ar trebui să fie insolubile în amestecul final de tratament. Pentru substanțele de testat care sunt deja citotoxice la concentrații mai mici de 5 mg/placă sau 5 µl/placă, testarea ar trebui să se realizeze până la o concentrație citotoxică. Ar trebui ca precipitatul să nu interfereze cu evaluarea rezultatelor.

Într-un test inițial, se recomandă utilizarea unui număr minim de cinci concentrații analizabile diferite, cu intervale între punctele de testare de aproximativ o semiunitate logaritmică (și anume √10). Pentru stabilirea unei relații concentrație – răspuns, intervale menționate mai reduse ar putea fi mai adecvate. Când se evaluează substanțe cu un conținut substanțial de posibile impurități mutagene, s-ar putea avea în vedere testarea la concentrații mai mari de 5 mg/placă sau 5 µl/placă.

1.5.2.3. *Martorii negativi și pozitivi*

Martorii pozitivi specifici suşei şi martorii negativi (solvent sau vehicul) utilizați în paralel, ar trebui să se includă în fiecare test, atât în prezența, cât și în absența activării metabolice. Pentru martorii pozitivi, ar trebui să fie selectate acele concentrații care permit să se demonstreze eficiența testului realizat.

Pentru testele care utilizează un sistem de activare metabolică, selectarea substanței sau a substanțelor de referință pentru martorii pozitivi ar trebui să se realizeze în funcție de tipul suşelor bacteriene utilizate.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi pentru testele cu activare metabolică:

Nr. CAS	Nr. EINECS	Substanța
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetilantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetilbenz[*a*]antracen
50-32-8	200-028-5	benzo[a]piren
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracen

▼B

Nr. CAS	Nr. EINECS	Substanța
50-18-0		ciclofosfamidă
6055-19-2	200-015-4	ciclofosfamidă monohidrat

Următoarea substanță este un martor pozitiv adecvat pentru metoda de activare metabolică reductivă:

573-58-0	209-358-4	Roșu de Congo

2-aminoantracenul nu ar trebui să se utilizeze ca indicator unic al eficienței amestecului S9. Dacă se utilizează 2-aminoantracenul, fiecare lot de S9 ar trebui să fie, de asemenea, caracterizat cu un mutagen care necesită o activare metabolică de către enzimele microzomiale, de exemplu benzo[a]pirenul, dimetilbenzantracenul.

În tabelul următor sunt prezentate exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi specifici sușei pentru testele realizate fără un sistem de activare metabolică exogenă:

Nr. CAS	Nr. EINECS	Substanța	Sușa
26628-22-8	247-852-1	azidă de sodiu	TA 1535 și TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoacridină	TA 1537, TA 97 și TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 și TA 97a
80-15-9	201-254-7	hidroperoxid de cumenă	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomicin C	WP2 uvrA și TA 102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidină	WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrochinolină-1-oxid	WP2, WP2 uvrA și WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furilfuramidă (AF2)	sușe cu conținut de plasmid

Se pot utiliza și alte substanțe de referință ca martori pozitivi corespunzători. Ar trebui să se aibă în vedere utilizarea unor martori pozitivi din aceeași clasă chimică, dacă sunt disponibili.

Ar trebui să se utilizeze martori negativi, constituiți din solvent sau vehicul fără substanța de testat, dar tratați în același mod ca grupele cu tratament. În plus, ar trebui să se utilizeze și martori netratați, cu excepția cazului în care există date din testele anterioare care să ateste că solventul ales nu are efecte dăunătoare sau mutagene.

▼B

1.5.3. **Mod de lucru**

Pentru metoda de încorporare prin depunere pe o placă (1) (2) (3) (4), fără activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de soluție de testat, 0,1 ml de cultură bacteriană proaspătă (ce conține aproximativ 10^8 celule viabile) și 0,5 ml de tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire (agar). Pentru testul cu activare metabolică, se prepară, de obicei, un amestec din 0,5 ml preparat de activare metabolică, ce conține o cantitate specifică de fracție postmitocondrială (în proporție de 5 până la 30 % v/v în preparatul de activare metabolică), 2,0 ml de geloză de acoperire, bacterii și substanța de testat/soluția de testat. Conținutul din fiecare eprubetă se agită și se toarnă pe suprafața unui mediu minimal de geloză depus pe placă. Geloza de acoperire se lasă să se solidifice înainte de incubare.

Pentru metoda de preincubare (2) (3) (5) (6), substanța de testat/soluția de testat se supune la preincubare împreună cu sușa experimentală (ce conține aproximativ 10^8 celule viabile) și cu tamponul steril sau sistemul de activare metabolică (0,5 ml) de obicei timp de 20 de minute sau mai mult, la 30-37 °C, înainte de a fi amestecată cu geloza de acoperire și turnată pe suprafața unui mediu minimal de geloză depus pe placă. De obicei, se prepară un amestec din 0,05 ml sau 0,1 ml de substanță de testat/soluție de testat, 0,1 ml bacterii și 0,5 ml amestec S9 sau tampon steril cu 2,0 ml geloză de acoperire. Eprubetele ar trebui să fie aerate cu ajutorul unui agitator în timpul preincubării.

Pentru o bună estimare a variației, ar trebui să se utilizeze câte trei plăci cu depuneri pentru fiecare doză. Se acceptă utilizarea a doar două plăci cu depuneri, dacă se justifică științific acest lucru. Pierderea ocazională a unei plăci nu invalidează în mod necesar testul.

Substanțele în stare gazoasă sau cele volatile ar trebui să fie testate în condiții corespunzătoare, de exemplu în vase închise ermetic (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubarea**

Toată plăcile dintr-un test dat ar trebui să fie incubate la 37 °C timp de 48-72 de ore. După incubare, se procedează la numărătoarea coloniilor care provoacă reversia de pe fiecare placă.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele ar trebui să se prezinte sub forma numărului de colonii care provoacă reversia de pe fiecare placă. De asemenea, ar trebui să se prezinte numărul de colonii care provoacă reversie, atât pe plăcile cu martor negativ (martor solvent și martor netratat, dacă s-a utilizat), cât și pentru plăcile cu martor pozitiv. Ar trebui să se prezinte numărătoarea pentru fiecare placă, numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard pentru substanța de testat și pentru martorii pozitivi și negativi (netratați și solvent).

Nu este necesară verificarea unui răspuns clar pozitiv. Rezultatele nesigure ar trebui să fie clarificate prin teste suplimentare, realizate de preferință prin modificarea uneia dintre condițiile de testare. Rezultatele negative necesită confirmare pentru fiecare caz. În cazurile în care se consideră că nu este necesară confirmarea rezultatelor negative, ar trebui să se ofere o justificare. Pentru testele de confirmare ar trebui să se aibă în vedere modificarea condițiilor de testare pentru lărgirea gamei de condiții evaluate. Condițiile de testare care ar putea fi modificate includ diferența dintre concentrații, metoda de tratament (încorporarea prin depunere pe placă sau preincubarea în mediu lichid) și condițiile de activare metabolică.

▼B

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Există câteva criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, precum creșterea în funcție de concentrație peste intervalul testat și o creștere reproductibilă a uneia sau mai multor concentrații ale numărului de colonii care provoacă reversia per placă, la cel puțin o sușă cu sau fără sistem de activare metabolică (23). În primul rând ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice (24). Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Dacă rezultatele pentru o substanță de testat nu îndeplinesc criteriile menționate anterior, substanța respectivă se consideră a fi nemutagenă în prezentul test.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în unele cazuri rare datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile, independent de numărul de experimente.

Rezultatele pozitive ale unui test de mutație bacteriană inversă indică faptul că substanța de testat induce mutații punctiforme prin substituirea bazelor sau decalarea cadrului de citire în genomul de *Salmonella typhimurium* și/sau *Escherichia coli*. Rezultatele negative indică faptul că, în condiții de testare, substanța de testat nu este mutagenă pentru speciile testate.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Sușele:

— sușele utilizate;

— numărul de celule per cultură;

— caracteristicile sușei.

Condițiile de testare:

— cantitatea de substanță de testat per placă (mg/placă sau µl/placă) cu justificarea alegerii dozei și numărului de plăci per concentrație;

— mediile utilizate;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică, inclusiv criteriile de acceptabilitate;

— procedurile de tratament.

Rezultatele:

— semnele de toxicitate;

— semnele de precipitare;

— numărătoarea pentru fiecare placă;

▼B

— numărul mediu de colonii care provoacă reversia pentru fiecare placă și deviația standard;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— analizele statistice, dacă există;

— datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel, cu domenii, valori medii și deviații standard;

— datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați anterior, cu domenii, valori medii și deviații standard.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

2. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

4. Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, pp. 69-240.

5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, pp. 91-96.

6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

7. Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

8. Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, pp. 167-177.

9. Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutations Res., 38, pp. 33-42.

10. Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

11. Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

13. Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

14. Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2-141.

15. Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

16. Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salomonella typhimurium, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres *et al.* Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

21. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

23. Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

24. Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼M8

B.17. TESTE *IN VITRO* DE MUTAȚIE GENICĂ PE CELULE DE MAMIFERE FOLOSIND GENELE HPRT ȘI XPRT

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 476 privind testarea (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor științifice, al necesităților fluctuante de reglementare și al bunăstării animalelor. Actuala versiune revizuită a MT B.17 reflectă aproape treizeci de ani de experiență în ceea ce privește acest test și, de asemenea, constituie rezultatul dezvoltării unei noi metode separate dedicate testelor *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere folosind gena timidin-kinază. MT B.17 face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului *in vitro* de mutație genică pe celule de mamifere este detectarea mutațiilor genice induse de substanțe chimice. Liniile celulare utilizate în aceste teste măsoară mutațiile directe la genele reporter, în special la gena endogenă hipoxantin-guanină fosforibozil transferază (Hprt la celulele de rozătoare, HPRT la celulele umane; denumite colectiv gena Hprt și testul HPRT în cadrul prezentei metode de testare), precum și la transgena de xantin-guanină fosforibozil transferază (gpt) (denumit testul XPRT). Testele de mutație HPRT și XPRT permit detectarea diferitelor spectre de fenomene genetice. În plus față de mutațiile detectate prin testul HPRT (de exemplu, substituții ale perechilor de bază, decalări ale cadrului de citire, mici deleții și inserții), localizarea autozomică a transgenei gpt ar putea permite detectarea mutațiilor produse ca urmare a unor deleții semnificative și, eventual, a recombinării mitotice care nu este detectată prin testul HPRT, deoarece gena Hprt se află pe cromozomul X (2) (3) (4) (5) (6) (7). În prezent, XPRT este mai puțin utilizat decât testul HPRT în scopuri de reglementare.

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

4. Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*.

5. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar conduce la rezultate pozitive artificiale (și anume, o posibilă interacțiune cu sistemul de testare), care nu sunt cauzate de interacțiunea directă dintre substanțele chimice de testat și materialul genetic al celulei; astfel de condiții includ modificări ale pH-ului sau ale osmolalității (8) (9) (10), interacțiunea cu componentele de mediu (11) (12) sau niveluri excesive ale citotoxicității (13). Citotoxicitatea care depășește nivelurile recomandate de citotoxicitate de vârf, astfel cum sunt definite la punctul 19, este considerată excesivă pentru testul HPRT.

▼**M8**

6. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Celulele mutante deficiente în activitatea enzimei Hprt în cadrul testului HPRT sau în activitatea enzimei xprt în cadrul testului XPRT sunt rezistente la efectele citostatice ale substanței 6-tioguanină purină analogă (TG). Celulele care conțin enzima Hprt (în cadrul testului HPRT) sau gpt (în cadrul testului XPRT) sunt sensibile la TG, ceea ce produce inhibarea metabolismului celular și oprirea diviziunii celulare. Astfel, celulele mutante pot prolifera în prezența TG, în timp ce celulele normale, care conțin enzima Hprt (în cadrul testului HPRT) sau gpt (în cadrul testului XPRT), nu pot prolifera.

8. Celulele în suspensie sau culturile monostrat sunt expuse la substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unei surse exogene de activare metabolică (a se vedea punctul 14), pentru o perioadă adecvată de timp (3-6 ore) și apoi subcultivate pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite expresia fenotipică înaintea selecției mutantului (14) (15) (16) (17). Citotoxicitatea este determinată prin supraviețuire relativă (RS), și anume, eficacitatea clonării măsurată imediat după tratament și ajustată pentru orice pierdere de celule în timpul tratamentului comparativ cu martorul negativ (punctul 18 și apendicele 2). Culturile tratate sunt menținute în mediul de cultură un timp suficient, caracteristic pentru fiecare tip de celulă, pentru a permite o expresie fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse (de regulă, minim 7-9 zile). În urma manifestării fenotipice, frecvența mutanților se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta coloniile mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența mutanților se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției mutantului.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Celule

9. Tipurile de celule utilizate pentru testele HPRT și XPRT ar trebui să aibă o sensibilitate demonstrată la mutageni chimici, o eficacitate de clonare mare, un cariotip stabil și o frecvență stabilă a celulelor mutante spontane. Cele mai frecvent utilizate celule pentru testul HPRT includ liniile CHO, CHL și V79 de celule de hamster chinezesc, celule de limfom de șoarece L5178Y și celule limfoblastoide umane TK6 (18) (19). Celulele AS52 derivate din CHO, care conțin transgena gpt (dar nu și gena Hprt) sunt utilizate pentru testul XPRT (20) (21); testul HPRT nu poate fi efectuat pe celule AS52, deoarece gena hprt a fost eliminată. Utilizarea altor linii celulare ar trebui să fie justificată și validată.

10. Liniile celulare ar trebui să fie controlate în mod regulat pentru verificarea stabilității numărului modal de cromozomi și a absenței contaminării cu micoplasmă (22) (23), iar, în cazul în care se constată contaminarea sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a modificat, celulele nu se mai utilizează. Ar trebui să se stabilească durata normală a ciclului celular utilizată în laboratorul de testare, iar aceasta ar trebui să fie conformă cu caracteristicile celulare publicate. Frecvența celulei mutante spontane în

▼M8

stocul de celule mamă ar trebui să fie, de asemenea, verificată, iar stocul nu ar trebui utilizat în cazul în care frecvența mutanților nu este acceptabilă.

11. Înainte de utilizare în cadrul acestui test, este posibil să fie necesară curățarea culturilor de celule mutante preexistente, de exemplu, prin cultivare în mediul HAT pentru testul HPRT și în MPA pentru testul XPRT (5) (24) (a se vedea apendicele 1). Celulele curățate pot fi păstrate în mediu criogenic și apoi decongelate pentru a fi utilizate ca stocuri de lucru. Stocul de lucru proaspăt decongelat poate fi utilizat pentru testare după încheierea perioadelor normale de dublare. Atunci când este efectuat testul XPRT, cultura de rutină a celulelor AS52 ar trebui să utilizeze condiții care asigură menținerea transgenei gpt (20).

Condiții pentru medii și cultură

12. Ar trebui să fie asigurate condiții adecvate pentru mediul de cultură și incubare (vase de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO_2 și temperatura de incubare de 37 °C) pentru menținerea culturilor. Culturile de celule ar trebui să fie menținute întotdeauna în condiții care să asigure creșterea acestora în faza de dezvoltare logaritmică. Este deosebit de important să se aleagă condiții de medii și de cultură astfel încât să se asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și eficacitatea optimă a clonării atât pentru celulele mutante, cât și pentru cele nemutante.

Pregătirea culturilor

13. Liniile celulare se propagă din culturi stoc, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat să continue să crească exponențial în perioadele de tratament și manifestare (de exemplu, ar trebui să se evite confluența celulelor care cresc în monostrat).

Activare metabolică

14. Recurgerea la un sistem endogen de activare metabolică este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate endogenă metabolică inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) sau un amestec de fenobarbital și β-naftoflavonă (29) (30) (31) (32). Utilizarea celui din urmă amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (33) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca și Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (29) (31). Fracția S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Alegerea tipului și concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testate (34) (35) (36).

Prepararea substanței chimice de testat

15. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui să fie preparate în solvenți adecvați și diluate, dacă este cazul, înainte de tratamentul aplicat celulelor (a se vedea punctul 16). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Gazele sau substanțele chimice de testat volatile necesită o modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de vase de cultură închise ermetic (37) (38). Preparatele cu substanța chimică de testat ar trebui să fie realizate anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în ceea ce privește acceptabilitatea condițiilor de stocare.

▼M8

CONDIȚII DE TESTARE

Solvenți

16. Solventul ar trebui ales pentru a optimiza solubilitatea substanțelor chimice de testat fără a afecta negativ desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau a unui mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt, de exemplu, apa și dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu ar trebui să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu ar trebui să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care solvenții utilizați nu sunt bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora ar trebui să fie justificată prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanța chimică de testat și cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

Măsurarea citotoxicității și alegerea concentrațiilor de expunere

17. În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, ar trebui să se evite concentrațiile susceptibile de a produce răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 20), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 21) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 5). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului la momentul adăugării acesteia, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

18. Selecția concentrației este efectuată în funcție de citotoxicitate și pe baza altor considerente (a se vedea punctele 20-22). Chiar dacă evaluarea citotoxicității în cadrul unui test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, efectuarea unui test inițial nu este obligatorie. Chiar dacă se realizează o evaluare inițială a citotoxicității, măsurarea citotoxicității pentru fiecare cultură este totuși necesară în cadrul experimentului principal. Citotoxicitatea ar trebui să fie evaluată cu ajutorul RS, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, pe baza numărului de celule, în comparație cu ajustarea eficacității clonării la martorii negativi (cărora li se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea apendicele 2 pentru formulă).

19. Ar trebui să se evalueze cel puțin patru concentrații de testat (fără a include martorii cu solvent și cei pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Chiar dacă se recomandă utilizarea culturilor duplicat, se poate utiliza fie cultura duplicat, fie cultura tratată ca fiind unică în cadrul fiecărei concentrații testate. Rezultatele obținute în ceea ce privește culturile duplicate independente la o concentrație dată ar trebui să fie consemnate separat, însă pot fi grupate pentru analiza datelor (17). În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate ar trebui să acopere un interval de la concentrația care produce citotoxicitate până la concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau la care nu există citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante abrupte, iar pentru a acoperi întregul interval de valori de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația concentrație-răspuns, ar putea fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și mai mult de patru concentrații,

▼M8

în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 43). Utilizarea a peste patru concentrații poate fi deosebit de importantă atunci când se utilizează culturi unice.

20. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să vizeze obținerea unei valori cuprinse între 20 și 10 % RS. Ar trebui să se acorde atenție atunci când se interpretează rezultate pozitive identificate doar la valori de până la 10 % RS (punctul 43).

21. În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă apare citotoxicitatea la un nivel peste concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece pot rezulta efecte date de artefacte din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, ar trebui să se acorde atenție pentru a se asigura faptul că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului. Ar putea fi utilă determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment.

22. În cazul în care se constată inexistența precipitatului sau o citotoxicitate limitată, concentrația maximă de testare ar trebui să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml sau 2 µl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (39) (40). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse cu reacție complexă sau materiale biologice [și anume, substanțele chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă (UVCB)] (41), extracte din mediu etc., este posibil să fie necesară o concentrație de vârf mai mare (de exemplu, 5 mg/ml), în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecăreia dintre componente. Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (42).

Martori

23. Pentru fiecare condiție experimentală ar trebui să se includă martori negativi testați concomitent (a se vedea punctul 16) constituiți doar dintr-un solvent în mediul de tratare și tratați în aceleași condiții precum culturile de tratare.

24. Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului de a identifica substanțe mutagene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică, după caz. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Pot fi utilizate substanțe martor pozitive alternative, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* pe celule de mamifere pentru toxicitate genetică sunt suficient de standardizate, pot fi efectuate teste folosind tratamente cu și fără activare metabolică exogenă, cu utilizarea unui singur martor pozitiv care necesită activare metabolică. În acest caz, acest răspuns al unicului martor pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Fiecare martor pozitiv ar trebui să fie utilizat la una sau mai multe concentrații prevăzute a genera creșteri reproductibile și detectabile față de cele de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare, iar răspunsul nu ar trebui să fie compromis de citotoxicitate care depășește limitele specificate în prezenta metodă de testare (a se vedea punctul 20).

▼M8

Tabelul 1

Substanțe de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Condiția activării metabolice	Locus	Substanța și nr. CAS
Absența activării metabolice exogene	*Hprt*	Metan-sulfonat de etil [CAS nr. 62-50-0] Etil nitrozouree [CAS nr. 759-73-9] 4-nitrochinolină 1-oxid [CAS nr. 56-57-5]
	xprt	Streptonigrină [CAS nr. 3930-19-6] Mitomicină C [CAS nr. 50-07-7]
Prezența activării metabolice exogene	*Hprt*	3-metilcolantren [CAS nr. 56-49-5] 7,12-dimetilbenzantracen [CAS nr. 57-97-6] Benzopiren [CAS nr. 50-32-8]
	xprt	Benzopiren [CAS nr. 50-32-8]

PROCEDURA

Tratamentul cu substanța chimică de testat

25. Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp de 3 până la 6 ore este suficient).

26. Numărul minim de celule utilizate pentru fiecare cultură de testare (martor și tratată) în fiecare etapă a testului ar trebui să depindă de frecvența celulelor mutante spontane. Orientarea generală este să se trateze și să se treacă suficiente celule pentru a menține 10 celule mutante spontane în fiecare cultură în toate etapele testului (17). Frecvența celulelor mutante spontane se situează, în general, între 5 și 20 × 10-6. Pentru o frecvență spontană a celulelor mutante de 5 × 10-6 și pentru a menține un număr suficient de celule mutante spontane (10 sau mai multe) chiar și pentru culturile tratate la concentrații care provoacă 90 % citotoxicitate în timpul tratamentului (10 % RS), ar fi necesar să se trateze cel puțin 20 × 106 celule. În plus, în perioada de manifestare, trebuie cultivate un număr suficient de celule (dar niciodată sub 2 milioane) care să fie placate pentru selecția celulelor mutante (17).

Timpul de expresie fenotipică și măsurarea frecvenței celulelor mutante

27. După perioada de tratament, celulele sunt cultivate pentru a permite manifestarea fenotipului mutant. În general, minim 7-9 zile sunt suficiente pentru a permite manifestarea fenotipică aproape optimă a celulelor mutante nou induse Hprt și xprt (43) (44). În această perioadă, celulele sunt subcultivate în mod regulat pentru a le menține într-o creștere exponențială. După manifestarea fenotipică, celulele sunt replacate în mediu cu și fără agent selectiv (6-tioguanină) pentru determinarea numărului de celule mutante și, respectiv, a eficacității clonării la momentul selecției. Această placare se poate realiza prin utilizarea de plăcuțe pentru culturi monostrat sau de plăci cu micro-godeuri pentru celule în suspensie. Pentru selectarea celulelor mutante, celulele ar trebui să fie placate la o densitate pentru a asigura recuperarea optimă a respectivelor celule mutante (și anume, pentru a se evita cooperarea metabolică) (17). Plăcile sunt incubate pentru o perioadă adecvată de timp pentru creșterea optimă a coloniilor (de exemplu, 7-12 zile) și coloniile sunt numărate. Frecvența celulelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției celulelor mutante (a se vedea apendicele 2 pentru formule).

▼M8

Competența de laborator

28. Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestuia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul ar trebui să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe pozitive de referință care acționează prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică, alese dintre substanțele enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (utilizând diferiți solvenți/diferite vehicule). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi ar trebui să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, celor care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctele 30-33.

29. În absența și în prezența activării metabolice ar trebui să se examineze o selecție de substanțe martor pozitive (a se vedea tabelul 1 de la punctul 25), pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțele chimice mutagene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al condițiilor de creștere a celulelor în timpul tratamentului, al manifestării fenotipice și al selecției celulelor mutante, precum și al procedurilor de punctare. Ar trebui să se aleagă o plajă de valori ale concentrațiilor substanțelor chimice selectate astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date anterioare privind martorii testați

30. Laboratorul ar trebui să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

31. La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel ar trebui să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori (22). Pe măsură ce se adaugă tot mai multe date experimentale la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel ar trebui să fie, în mod ideal, în limitele de control de 95 % ale respectivei distribuții (17) (45) (46).

32. Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului ar trebui să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele ar trebui să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X (47)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (46). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot construi și utiliza datele istorice (și anume, criteriile de includere și excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (45).

33. Datele privind martorii negativi ar trebui să constea în frecvențe ale celulelor mutante dintr-o cultură unică sau, de preferință, din culturi duplicate, astfel cum este descris la punctul 23. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, în limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (17) (45) (46). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitei de 95 % a martorilor, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea mai sus) și nu există nicio dovadă a unor erori tehnice sau umane.

▼M8

34. Orice modificare a protocolului experimental ar trebui să fie luată în considerare în ceea ce privește consecvența acesteia cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră ar trebui să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

35. Prezentarea rezultatelor ar trebui să includă toate datele necesare pentru calcularea citotoxicității (exprimată ca RS). Datele, atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor, ar trebui să includă numărul de celule la sfârșitul tratamentului, numărul de celule placate imediat după tratament și numărul de colonii (sau numărul de godeuri fără colonii, în cazul metodei cu micro-godeuri). Valoarea RS pentru fiecare cultură ar trebui exprimată ca procent raportat la martorul tratat cu solvent testat în paralel (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

36. Prezentarea rezultatelor ar trebui să includă, de asemenea, toate datele necesare pentru calcularea frecvenței celulelor mutante. Datele pentru culturile tratate și cele martor ar trebui să includă: (1) numărul de celule placate cu și fără agent selectiv (în momentul în care celulele sunt placate pentru selecția celulelor mutante) și (2) numărul coloniilor numărate (sau numărul de godeuri fără colonii, în cazul metodei cu micro-godeuri) din plăcile cu și fără agent selectiv. Frecvența celulelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de mutanți (pe plăci cu agent selectiv), corectat prin eficacitatea clonării (pe plăcile fără agent selectiv). Frecvența celulelor mutante ar trebui să fie exprimată ca fiind numărul de celule mutante pe milion de celule viabile (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

37. Ar trebui să fie prezentate date pentru fiecare cultură în parte. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate sub formă de tabel.

Criterii de acceptabilitate

38. Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

— Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru a fi adăugat în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 33.

— Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 24) ar trebui să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

— Două condiții experimentale (și anume, cu și fără activare metabolică) au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (a se vedea punctul 25).

— Se pot analiza un număr adecvat de celule și concentrații (punctele 25, 26 și 19).

— Criteriile de selecție ale concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 20, 21 și 22.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

39. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate:

▼M8

— cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de concentrație,

— Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 33).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce mutații ale genelor la celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (46) (48).

40. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată în mod clar negativă dacă, în toate condițiile experimentale examinate:

— niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

— toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 33).

Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a provoca mutații ale genelor la celulele de mamifere în cultură în cadrul acestui sistem de testare.

41. Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

42. În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv, astfel cum este descris mai sus sau pentru a ajuta la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele ar trebui să fie evaluate de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Ar putea fi util să se desfășoare un experiment repetat, eventual folosind condiții experimentale modificate [de exemplu, stabilirea unei distanțe între concentrații, alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrația S9 sau originea S9)].

43. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative. Prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat ar trebui să fie concluzionat ca fiind echivoc (interpretat cu aceeași probabilitate de a fi pozitiv sau negativ).

Raportul testului

44. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

▼**M8**

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului;

— procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

Pentru culturile principale din laborator:

— tipul, sursa liniilor celulare;

— numărul de treceri, dacă există, precum și istoricul în laborator;

— caracteristicile cariotipului și/sau numărul modal de cromozomi;

— metode de întreținere a culturilor de celule;

— absența micoplasmei;

— perioade de dublare a celulelor.

Condiții de testare:

— justificarea selectării concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;

— compoziția mediilor de cultură, concentrația de CO_2, nivelul de umiditate;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura de incubare;

— timpul de incubare;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară în timpul tratamentului;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9); substanțe martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare condiție de tratament;

— timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate, subculturile și programele de alimentare, dacă este cazul);

▼**M8**

— identitatea agentului selectiv și a concentrației acestuia;

— criteriile pentru acceptarea testelor;

— metodele utilizate pentru numărarea celulelor viabile și mutante;

— metodele utilizate pentru măsurarea citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— durata perioadelor de incubare după placare;

— criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

— numărul de celule tratate și numărul de celule subcultivate pentru fiecare cultură;

— măsurători ale citotoxicității și alte observații, dacă este cazul;

— semne de precipitare și ora determinării;

— numărul de celule placată în mediu selectiv și neselectiv;

— numărul de colonii în mediul neselectiv și numărul de colonii rezistente în mediu selectiv și frecvențele celulelor mutante aferente;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— datele anterioare privind martorii negativi (cu solvent) și cei pozitivi, cu intervale, valori medii și abateri standard, precum și intervale de încredere (de exemplu, 95 %) și numărul de date;

— analize statistice (pentru culturi individuale și duplicate grupate, dacă este cazul) și valori p, dacă există.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. și Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. și Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. și Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. și Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. și Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. și Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. și Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. și Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. și Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. și Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L. și Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. și Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. și Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. și Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P. și Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R. și Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M. și Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. și Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. și Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. și de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. și Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. și Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. și Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. și Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. și Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. și Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. și Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. și Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Programul Organizației Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP). Publicație disponibilă la adresa: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. și Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. și McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. și Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Orientările nr. 473, 476 și 487 privind testarea). Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică.

(40) Brookmire L., Chen J.J. și Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Publicație disponibilă la adresa: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. și Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L. și Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J. și Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety, Series on Testing and Assessment, (nr. 199), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O.și Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B. și Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, a treia ediție, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază: Substanțe chimice care cauzează substituția perechilor de bază în ADN.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eficacitatea clonării: Procentul de celule placate la o densitate scăzută, care pot crește într-o colonie care poate fi numărată.

Concentrații: se referă la concentrații finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Citotoxicitate: Pentru testele incluse în prezenta metodă de testare, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a supraviețuirii relative a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul specific).

Mutație directă: o mutație a genelor de la forma parentală la forma mutantă care generează o modificare sau o pierdere a activității enzimatice sau a funcției proteinei codificate.

Mutageni de decalare a cadrului de citire: substanțe chimice care provoacă adăugarea sau ștergerea uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv ruperi ale ADN-ului, aducții, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Mediul HAT: Mediu care conține hipoxantină, aminopterină și timidină, utilizate pentru curățarea celulelor mutante Hprt.

Recombinare mitotică: În timpul mitozei, recombinarea între cromatide omoloage, ceea ce ar putea conduce la inducerea unor rupturi duble ale șirului ADN sau la pierderea heterozigozității.

Mediul MPA: Mediu care conține xantină, adenină, timidină, aminopterină și acid micofenolic utilizat pentru curățarea genelor mutante Xprt.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Frecvența mutanților (FM): numărul de colonii de celule mutante observate împărțit la numărul de celule placate într-un mediu selectiv, corectat pentru eficacitatea (sau viabilitatea) clonării la momentul selecției.

Timpul de expresie fenotipică: Timpul după tratament, în care modificarea genetică se fixează în interiorul genomului și orice produse genetice preexistente sunt epuizate până la modificarea trăsăturii fenotipice.

Supraviețuire relativă (RS): RS este utilizat ca indicator al citotoxicității legate de tratament. RS constituie eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

▼**M8**

Amestec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Martor tratat cu solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc doar solventul, care este utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Martor netratat: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici substanță chimică de testat, nici solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan și în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice

▼M8

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII ȘI A FRECVENȚEI GENELOR MUTANTE

Citotoxicitatea este evaluată prin supraviețuirea relativă, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea ajustată a clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea formula RS de mai jos).

EC ajustată pentru o cultură tratată printr-o substanță chimică de testat se calculează ca:

$$\text{EC ajustată} = \frac{\text{Numărul de celule la sfârșitul tratamentului}}{\text{Numărul de celule la începutul tratamentului}}$$

RS ajustată pentru o cultură tratată cu o substanță chimică de testat se calculează după cum urmează:

$$\text{RS} = \frac{\text{EC ajustată în cultura tratată}}{\text{EC ajustată în martorul tratat cu solvent}} \times 100$$

Frecvența genelor mutante reprezintă eficacitatea clonării coloniilor de gene mutante în mediu selectiv împărțită la eficacitatea clonării în mediu neselectiv, măsurată pentru aceeași cultură la momentul selecției.

$$\text{Frecventa genelor mutante} = \frac{\text{Eficacitatea clonării coloniilor mutante în mediu selectiv}}{\text{Eficacitatea clonării în mediu selectiv}}$$

În cazul în care se utilizează plăci pentru eficacitatea clonării:

EC = Număr de colonii/Număr de celule placate.

Atunci când se utilizează plăci cu micro-godeuri pentru eficacitatea clonării:

Numărul de colonii per godeu pe plăcile cu micro-godeuri respectă o distribuție Poisson.

Eficacitatea clonării = -LnP (0)/Numărul celulelor placate per godeu

Unde -LnP(0) este numărul probabil de godeuri goale dintre godeurile însămânțate și este descris prin următoarea formulă

LnP(0) = -Ln (număr de godeuri goale/numărul de godeuri placate)

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. TEST *IN VITRO* DE TRANSFORMARE A CELULELOR DE MAMIFERE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚIE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Pentru determinarea modificărilor fenotipice *in vitro* induse de substanțele chimice asociate cu transformări maligne *in vivo*, se folosesc sisteme de cultură de celule de mamifere. Cele mai des utilizate celule sunt C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE și celule de la șobolani Fisher. Testele urmăresc modificările în morfologia celulară, formarea de focare sau modificări în dependența de ancorare pe agar-agar semisolid. Există sisteme folosite mai rar care depistează alte modificări celulare morfologice sau fiziologice în urma expunerii la substanțe chimice cancerigene. Niciunul din mecanismele testate *in vitro* nu are o legătură mecanică determinată cu cancerul. Anumite sisteme de testare pot detecta promotori tumorali. Citotoxicitatea poate fi determinată prin măsurarea efectelor materialului testat asupra capacităților de formare de colonii (eficiența de clonare) sau asupra ratei de creștere a culturilor. Măsurarea citotoxicității are rolul de a stabili dacă expunerea la substanța chimică testată are relevanță toxicologică, dar nu poate fi folosită pentru a calcula frecvența transformărilor în toate testele, deoarece unele dintre acestea pot necesita incubare prelungită și/sau reînsămânțare.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Pregătire

Celule

În funcție de testul de transformare folosit, sunt disponibile diferite linii celulare sau celule primare. Cercetătorul trebuie să se asigure că celulele folosite în cadrul testului manifestă modificări fenotipice corespunzătoare după expunerea la un agent cancerigen cunoscut și că testul efectuat are o validitate și o fiabilitate demonstrate și documentate.

Mediu

Se utilizează medii și condiții de testare corespunzătoare testului de transformare efectuat.

▼B

Substanța de testat

Substanțele testate pot fi preparate în mediile de cultură sau dizolvate ori suspensionate într-un vehicul adecvat, înainte de tratarea celulelor. Concentrația finală a vehiculului în sistem nu trebuie să afecteze viabilitatea celulară, rata de creștere sau incidența transformărilor.

Activarea metabolică

Celulele sunt expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. Dacă se utilizează un tip de celule cu activitate metabolică intrinsecă, natura acestei activități va fi recunoscută ca fiind adecvată clasei de substanțe chimice testate.

Condiții de testare

Utilizarea martorilor pozitivi și negativi

În fiecare experiment se includ martori pozitivi, utilizându-se atât un compus cu acțiune directă, cât și un compus ce necesită activare metabolică; de asemenea, se utilizează și un martor negativ (pentru vehicul).

Printre exemplele de substanțe ce pot fi folosite ca martor pozitiv se numără:

— compuși cu acțiune directă:

  — etilmetansulfonatul,

  — β-propiolactona;

— compuși care necesită activare metabolică:

  — 2-acetilaminofluoren,

  — 4-dimetilaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetilbenzantracen.

Dacă este necesar, poate fi inclus un martor pozitiv suplimentar care să aparțină aceleiași clase de substanțe ca și substanța de testat.

Concentrații de expunere

Se folosesc mai multe concentrații ale substanței de testat. Acestea trebuie să prezinte efect toxic în funcție de concentrație, concentrația maximă determinând un nivel scăzut de supraviețuire, iar supraviețuirea la concentrația minimă fiind aproximativ aceeași cu cea de la martorul negativ. Pentru substanțele relativ insolubile în apă trebuie testată limita superioară a solubilității, folosind procedee corespunzătoare. Pentru substanțele netoxice, foarte ușor solubile în apă, limita superioară a concentrației se stabilește de la caz la caz.

▼B

Mod de operare

Celulele se tratează o perioadă corespunzătoare, în funcție de sistemul de testare utilizat, acest lucru putând presupune reevaluarea dozei prin schimbarea mediului (și, după caz, un amestec de activare metabolică proaspăt) dacă expunerea este prelungită. Celulele fără o activitate metabolică intrinsecă suficientă sunt expuse la substanța de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem adecvat de activare metabolică. La sfârșitul perioadei de expunere, celulele trebuie spălate, îndepărtând substanța de testat, și cultivate în condiții adecvate pentru apariția modificărilor fenotipice urmărite și pentru stabilirea incidenței de transformare. Toate rezultatele trebuie confirmate în cadrul unui experiment independent.

2. **DATE**

Datele se sistematizează în tabele și pot avea diferite forme în funcție de metoda folosită, ca, de exemplu, numărarea plăcilor, plăci pozitive sau număr de celule transformate. După caz, supraviețuirea se exprimă ca procent din nivelul de supraviețuire la probele martor, iar frecvența de transformare ca raport între numărul de celule transformate și numărul de celule supraviețuitoare. Datele se evaluează prin metode statistice corespunzătoare.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— tipul de celule folosite, numărul de culturi celulare, metoda de menținere a culturilor;

— condițiile de testare: concentrația substanței de testat, vehiculul folosit, timpul de incubare, durata și frecvența tratamentului, densitatea celulară pe parcursul tratamentului, tipul de sistem exogen folosit pentru activarea metabolismului, martorii pozitivi și negativi, caracteristicile fenotipului monitorizat, tipul de sistem selectiv folosit (după caz), argumentarea alegerii dozelor;

— metoda folosită pentru exprimarea numărului de celule viabile și transformate;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

▼M8

B.22. **TESTUL DE LETALITATE DOMINANTĂ LA ROZĂTOARE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 478 privind testarea (TG) (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor ştiinţifice, al necesităţilor fluctuante de reglementare şi al consideraţiilor privind bunăstarea animalelor. Această versiune modificată a metodei de testare reflectă mai mult de 30 de ani de experienţă în ceea ce priveşte acest test, precum şi potenţialul de a integra sau de a combina acest test cu alte teste de toxicitate, precum studiile privind dezvoltarea toxicităţii şi toxicitatea pentru reproducere sau studiile de genotoxicitate; însă, din cauza limitărilor sale şi a utilizării unui număr mare de animale, acest test nu este prevăzut a fi utilizat ca metodă primară, ci ca o metodă de testare suplimentară care poate fi utilizată doar în cazul în care nu există nicio alternativă la cerinţele de reglementare. Combinarea testelor de toxicitate are potenţialul de a cruţa un număr mare de animale pentru a nu fi utilizate în testele de toxicitate. OCDE a elaborat un document care oferă informaţii succinte privind testarea pentru toxicologia genetică şi o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului de letalitate dominantă (LD) este de a verifica dacă substanţele chimice produc mutaţii ca urmare a aberaţiilor cromozomiale din celulele germinale. În plus, testul de letalitate dominantă este relevant pentru evaluarea genotoxicităţii deoarece, în pofida faptului că aceştia pot să difere de la o specie la alta, factorii metabolismului *in vivo*, farmacocinetica şi procesele de regenerare a ADN-ului sunt active şi contribuie la răspunsuri. Inducerea unei mutaţii LD după expunerea la o substanţă chimică de testat indică faptul că substanţa chimică a afectat ţesutul germinal al animalului de testare.

3. Mutaţiile LD provoacă moartea embrionului sau a fetusului. Inducerea mutaţiei LD după expunerea la o substanţă chimică de testat indică faptul că substanţa chimică a afectat celulele germinale ale animalului de testare.

4. Un test LD este util pentru confirmarea rezultatelor pozitive ale testelor pe baza punctelor finale somatice *in vivo* şi constituie un punct final relevant pentru estimarea pericolelor pentru om şi a riscului de boli genetice care se transmit pe linia germenilor. Însă, acest test necesită un număr mare de animale şi utilizarea intensivă a forţei de muncă; prin urmare, acesta este foarte costisitor şi de lungă durată. Deoarece frecvenţa spontană a mutaţiilor letale dominante este destul de mare, sensibilitatea testului pentru detectarea creşterilor mici ale frecvenţei mutaţiilor este, în general, limitată.

5. Definiţiile termenilor cheie sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAŢII INIŢIALE

6. Testul este desfăşurat cel mai frecvent pe şoareci (2) (3) (4), însă pot fi adecvate şi alte specii, cum ar fi şobolanii (5) (6) (7) (8), în unele cazuri, în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere ştiinţific. În general, LD-urile constituie rezultatul unor aberaţii cromozomiale brute (anomalii structurale şi numerice) (9) (10) (11), dar mutaţiile genetice nu pot fi excluse. O mutaţie LD este o mutaţie care se produce într-o celulă

▼M8

germinală în sine sau este fixată după fertilizare în embrionul timpuriu, care nu cauzează disfuncția gametelui, însă este letală pentru oul fertilizat sau embrionul aflat în dezvoltare.

7. Fiecare mascul este împerecheat în mod succesiv cu femele virgine la intervale de timp adecvate. Numărul de împerecheri în urma tratamentului depinde de scopul final al studiului LD (punctul 23) și ar trebui să se asigure evaluarea tuturor fazelor de maturare a celulelor germinale masculine pentru LD-uri (12).

8. În cazul în care există dovezi că substanța chimică testată sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu va (vor) ajunge la testicul, utilizarea acestui test nu este adecvată.

PRINCIPIUL TESTULUI

9. În general, masculii sunt expuși la o substanță chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt împerechiați cu femele virgine netratate. Diferitele tipuri de celule germinale pot fi testate prin utilizarea intervalelor de împerechere succesive. După împerechere, femelele sunt eutanasiate după o perioadă corespunzătoare de timp, iar uterele acestora sunt examinate pentru determinarea numărului de implanturi și de embrioni vii și morți. Mortalitatea dominantă a unei substanțe chimice de testat este determinată prin compararea implanturilor vii pentru o femelă din grupul tratat cu implanturile vii pentru o femelă din grupul martor tratat cu vehicul/solvent. Creșterea numărului de ovule implantate moarte per femelă în lotul tratat comparativ cu cele per femelă din grupul martor reflectă pierderea după implantare indusă de substanța chimică de testat. Pierderea după implantare se calculează prin determinarea raportului dintre implanturile moarte și cele totale la grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor. Pierderea înainte de implantare poate fi estimată prin compararea numărului de corpora lutea minus implanturile totale sau numărul total de implanturi per femelă în grupul tratat și cel martor.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

10. Competența în cadrul acestui test ar trebui să fie stabilită prin demonstrarea capacității de a reproduce frecvențele letale dominante din datele publicate [de exemplu, (13) (14) (15) (16) (17) (18)] cu substanțe martor pozitive (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, precum și cu martori tratați cu vehicule, și prin obținerea de frecvențe ale martorilor negativi care constituie un interval de date consecvente acceptabile (a se vedea referințele de mai sus) sau cu distribuția anterioară a martorilor în cadrul laboratorului respectiv, dacă există.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

11. Ar trebui să se utilizeze sușe de laborator utilizate în mod curent de la animale mature din punct de vedere sexul și sănătoase. De regulă, se utilizează șoareci, însă șobolanii ar putea fi, de asemenea, adecvați. Orice altă specie adecvată de mamifere poate fi utilizată, în cazul în care se furnizează justificarea științifică în raport.

▼M8

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

12. În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (±3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Înainte de tratament sau de împerechere, rozătoarele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici (maximum cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează sau se observă vreun comportament agresiv, de preferat în cuști solide, cu o îmbogățire adecvată a mediului. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

13. Masculii și femelele sănătoase și mature din punct de vedere sexual se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, minim invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea degetului sau a urechii) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Se evită contaminarea încrucișată între martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Prepararea dozelor

14. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui dizolvate sau suspendate în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apa potabilă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. În cazul expunerilor la inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Ar trebui să se utilizeze preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condițiile de depozitare corespunzătoare.

Condiții de testare

Solvent/vehicul

15. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la volumele de dozare utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea unei reacții chimice cu substanța chimică de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora ar trebui să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Printre exemplele de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit se numără apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb.

Martori pozitivi

16. Ar trebui să se utilizeze întotdeauna, concomitent, animale ca martori pozitivi, cu excepția cazului în care laboratorul a demonstrat competență în efectuarea testului și a utilizat în mod curent testul în ultimii ani (de exemplu, în ultimii 5 ani). Însă nu este necesar să se trateze animalele care sunt martori pozitivi pe aceeași cale ca și animalele care primesc substanța chimică de testat sau să se eșantioneze toate intervalele de împerechere. Ar trebui să se cunoască faptul că substanțele martor pozitive produc LD-uri în condițiile utilizate pentru test. Cu excepția tratamentului, animalele

▼M8

din grupurile martor ar trebui tratate în mod identic cu cele din grupurile tratate.

17. Dozele substanțelor martor pozitive ar trebui să fie selectate astfel încât să producă efecte reduse sau moderate care evaluează în mod critic performanța și sensibilitatea testului, dar care produc în mod consecvent efecte de letalitate dominantă pozitive. Tabelul 1 include exemple de substanțe martor pozitive și dozele adecvate.

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive

Substanță [nr. CAS] (nr. de referință)	Interval de dozare eficace (mg/kg) (specii de rozătoare)	Timp de administrare (zile)
Trietilenmelamină [51-18-3] (15)	0,25 (șoareci)	1
Ciclofosfamidă [50-18-0] (19)	50-150 (șoareci)	5
Ciclofosfamidă [50-18-0] (5)	25-100 (șobolani)	1
Metansulfonat de etil [62-50-0] (13)	100-300 (șoareci)	5
Acrilamidă monomerică [79-06-1] (17)	50 (șoareci)	5
Clorambucil [305-03-3] (14)	25 (șoareci)	1

Martori negativi

18. Animalele martori negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile de tratament, ar trebui să fie incluse în fiecare moment de eșantionare (20). În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă LD-uri sau alte efecte vătămătoare, animalele martor netratate ar trebui să fie, de asemenea, incluse pentru fiecare moment de eșantionare, pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu vehicul.

PROCEDURA

Număr de animale

19. Masculii sunt împerecheați în mod secvențial la intervale adecvate prestabilite (de exemplu, intervale săptămânale, punctele 21 și 23), de preferat, cu o femelă virgină. Numărul de masculi per grup ar trebui să fie prestabilit pentru a fi suficient (în combinație cu numărul de femele împerecheate în fiecare interval de împerechere) pentru a furniza puterea statistică necesară pentru a detecta cel puțin o dublare a frecvenței LD (punctul 44).

20. Numărul de femele dintr-un interval de împerechere ar trebui să fie prestabilit, de asemenea, prin calcule ale puterii statistice pentru a permite identificarea a cel puțin unei dublări a frecvenței LD (și anume, un număr suficient de femele gestante care să furnizeze cel puțin 400 de implanturi totale) (20) (21) (22) (23) și pentru a preconiza cel puțin un implant mort pe unitate de analiză (de exemplu, grup de împerechere per doză) (24).

▼M8

Perioada de administrare și intervale de împerechere

21. Numărul de intervale de împerechere după tratament este reglementat de programul de tratament și ar trebui să asigure evaluarea tuturor fazelor de maturare a celulelor germinale masculine pentru inducția DL (12) (25). Pentru un singur tratament cu maxim cinci doze administrate zilnic, ar trebui să existe 8 (șoarece) sau 10 (șobolan) împerecheri la intervale săptămânale după ultimul tratament. În cazul administrării mai multor doze, numărul de intervale de împerechere poate fi redus proporțional cu creșterea duratei perioadei de administrare, însă cu menținerea obiectivului de evaluare a tuturor fazelor spermatogenezei (de exemplu, după o expunere de 28 de zile, numai 4 împerecheri săptămânale sunt suficiente pentru a evalua toate fazele spermatogenezei la șoarece). Toate programele de tratament și de împerechere ar trebui să fie justificate din punct de vedere științific.

22. Femelele ar trebui să rămână cu masculii cel puțin pe durata unui ciclu estral (de exemplu, o săptămână acoperă un ciclu estral atât la șoareci, cât și la șobolani). Femelele care nu s-au împerecheat într-un interval de o săptămână pot fi folosite pentru un interval de împerechere ulterior. În mod alternativ, până la împerechere, astfel cum este stabilit prin prezența spermei în vagin sau prin prezența unui dop vaginal.

23. Regimul de expunere și de împerechere utilizat depinde de obiectivul final al studiului LD. Dacă obiectivul este de a determina dacă o anumită substanță chimică induce mutații LD *per se*, atunci metoda acceptată ar fi să se expună o întreagă rundă de spermatogeneză (de exemplu, 7 săptămâni la șoarece, 5-7 tratamente pe săptămână) și să se realizeze împerecherea o dată, la sfârșit. Însă, dacă obiectivul este de a identifica tipul de celule germinale sensibile pentru inducerea LD, se preferă o expunere de o zi sau de 5 zile, urmată de împerecherea săptămânală.

Niveluri de dozare

24. În cazul în care este realizat un studiu preliminar de stabilire a dozelor deoarece nu există date adecvate disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta ar trebui să fie realizat în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă, sex și regim de tratament precum cele care urmează să fie utilizate în studiul principal (26). Obiectivul studiului este de a identifica doza maximă tolerată (DMT), definită drept doza cea mai mare care va fi tolerată fără dovezi de toxicitate care să limiteze studiul, în funcție de durata perioadei de studiu [de exemplu, comportament sau reacții anormale, reducerea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitatea sistemului hematopoietic), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care să necesite eutanasiere (27)].

25. De asemenea, DMT nu trebuie să afecteze negativ reușita împerecherii (21).

26. Substanțele chimice de testat cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturarea proprietăților toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui să fie evaluate de la caz la caz.

27. Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet ar trebui să includă un grup martor negativ și minim trei niveluri de dozare separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mult de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate în cadrul unui studiu de stabilire a plajei sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare ar trebui să fie de 2 000 mg/kg corp. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT ar trebui să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate ar trebui, de preferat, să

▼M8

acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau nu provoacă toxicitate. Pentru substanțele chimice netoxice, doza-limită pentru o perioadă de administrare de cel puțin 14 de zile este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, iar pentru perioade de administrare de mai puțin de 14 zile, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

Administrarea dozelor

28. La conceperea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, se pot alege căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea subcutanată, intravenoasă, locală, orală (prin gavaj) sau implantarea, dacă se justifică. În orice caz, calea ar trebui să fie aleasă astfel încât să se asigure expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în mod normal, deoarece nu este o cale prevăzută pentru expunerea umană și ar trebui să fie utilizată doar cu justificări științifice specifice. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și împerechere, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (punctul 31). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură priză depinde de dimensiunea animalului de testare. De regulă, volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza maxim 2 ml/100 g. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă legislația privind bunăstarea animalelor permite acest lucru). Variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Observații

29. Se recomandă emiterea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. În perioada de administrare a dozei, ar trebui să fie observate toate animalele, cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea și mortalitatea. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul studiului și cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor asupra dozelor repetate, precum și la momentul eutanasierii. Consumul de hrană ar trebui să fie măsurat cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, ar trebui să se măsoare consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă ar trebui să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (27).

Colectarea și prelucrarea țesuturilor

30. Femelele sunt eutanasiate în a doua jumătate a perioadei de sarcină, în ziua de gestație (ZG) 13 la șoareci și în ZG 14-15 la șobolani. Se examinează uterele pentru identificarea efectelor de letalitate dominantă în vederea determinării numărului de implanturi, de embrioni vii și morți și de corpi galbeni.

31. Coarnele uterine și ovarele sunt expuse pentru numărarea corpurilor galbene, iar fetușii sunt îndepărtați, numărați și cântăriți. Ar trebui să se examineze cu atenție uterele pentru identificarea de resorbții mascate de fetușii vii și să se asigure enumerarea tuturor resorbțiilor. Mortalitatea fetală este înregistrată. Se înregistrează, de asemenea, numărul de femele impregnate cu succes și numărul total de implantații, pierderile anterioare implantării și mortalitatea post-implantare (inclusiv resorbțiile timpurii sau târzii). În plus, fetușii vizibili pot fi conservați în fixator Bouin timp de cel puțin două

▼M8

săptămâni, iar apoi examinați pentru identificarea de malformații externe majore (28) pentru a furniza informații suplimentare cu privire la efectele de reproducere și de dezvoltare ale agentului de testat.

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

32. Datele ar trebui să fie prezentate în format tabelar pentru indicarea numărului de masculi împerecheați, de femele gestante și de femele negestante. Rezultatele fiecărei împerecheri, inclusiv identitatea fiecărui mascul și a fiecărei femele, ar trebui să fie consemnate individual. Pentru fiecare femelă ar trebui să se specifice intervalul de împerechere, nivelul dozei pentru masculii tratați și numărul implanturilor vii și al implanturilor moarte.

33. Pierderile din faza de post-implantare se calculează prin determinarea raportului dintre implanturile moarte și cele totale la grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor tratat cu vehicul/solvent.

34. Pierderile din faza de pre-implantare sunt calculate ca o diferență între numărul de corpuri galbene și numărul de implanturi sau ca o reducere a numărului mediu de implanturi per femelă în comparație cu împerecherile martor. În cazul în care se estimează pierderile din faza de pre-implantare, acestea ar trebui să fie consemnate.

35. Factorul de letalitate dominantă este estimat ca fiind: (decese post-implantare/implantări totale per femelă) × 100.

36. Ar trebui să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 29.

Criterii de acceptabilitate

37. Următoarele criterii determină acceptabilitatea unui test.

— Martorul negativ testat în paralel este în concordanță cu normele publicate referitoare la datele privind martorii negativi testați anterior și datele anterioare ale laboratorului privind martorii, dacă sunt disponibile (a se vedea punctele 10 și 18).

— Martorii pozitivi testați în paralel induc răspunsuri consecvente cu normele publicate pentru datele privind martorii pozitivi testați anterior sau cu baza de date a laboratorului privind martorii pozitivi testați anterior, dacă sunt disponibile, și produc o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 17 și 18).

— A fost analizat un număr adecvat de implanturi și doze totale (punctul 20).

— Criteriile pentru selecția dozei de vârf sunt în concordanță cu cele descrise la punctele 24 și 27.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

38. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, ar trebui să se analizeze cel puțin trei grupuri de doze tratate.

▼**M8**

39. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

— cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— creșterea este legată de doză în cel puțin o stare experimentală (de exemplu, un interval săptămânal de împerechere) atunci când evaluarea are loc în cadrul unui test corespunzător; și,

— oricare dintre aceste rezultate se situează în afara intervalului acceptabil de date privind martorul negativ, sau a distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată capabilă să inducă mutații de letalitate dominantă la celulele germinale ale animalelor de testare. În punctul 44 sunt prezentate recomandări privind cele mai adecvate metode statistice (44); alte abordări statistice recomandate pot fi găsite, de asemenea, în referințele bibliografice (20) (21) (22) (24) (29). Testele statistice utilizate ar trebui să considere animalul ca fiind unitatea experimentală.

40. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

— niciuna dintre dozele de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— nu există o creștere legată de doză în nicio condiție experimentală; și

— toate rezultatele se situează în intervalul acceptabil de date privind martorul negativ sau de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată incapabilă să inducă mutații de letalitate dominantă la celulele germinale ale animalelor de testare.

41. În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

42. În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat (de exemplu, o creștere ușoară sau la limită), datele ar trebui evaluate în cadrul unei expertize și/sau al unor investigații suplimentare, folosind datele experimentale existente, cum ar fi analiza problemei dacă rezultatul pozitiv se situează în afara intervalului acceptabil al datelor privind martorii negativi sau al datelor istorice privind martorii negativi din laborator (30).

43. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, se va concluziona că acesta este echivoc.

44. Testele statistice utilizate ar trebui să considere masculul ca fiind unitatea experimentală. Deși este posibil ca datele privind numărarea (de exemplu, numărul implanturilor pe femelă) să fie distribuite conform distribuției Poisson și/sau proporțiile (de exemplu, proporția implanturilor moarte) să fie distribuite binomial, aceste date sunt deseori dispersate excesiv (31). În consecință, analiza statistică ar trebui să recurgă mai întâi la un test pentru identificarea dispersiei deficitare-excesive utilizând teste de varianță, cum ar fi testul de varianță binomială al lui Cochran (32) sau testul C(α) al lui Tarone pentru dispersie binominală excesivă (31) (33). În cazul în care nu se detectează nicio abatere de la dispersia binomială, pot fi testate tendințele proporțiilor la diferite niveluri de doze prin testul Cochran-Armitage al tendințelor (34) și se pot testa comparațiile pe perechi cu grupul martor

▼M8

prin testul Fisher al exactității (35). De asemenea, în cazul în care nu se detectează nicio abatere de la dispersia Poisson, tendințele numărătorilor pot fi testate folosind regresia Poisson (36), iar comparațiile pe perechi cu grupul martor pot fi testate în contextul modelului Poisson, utilizând contraste pe perechi (36). În cazul în care se detectează o dispersie deficitară sau excesivă semnificativă, se recomandă metodele care nu sunt bazate pe parametri (23) (31). Printre acestea se numără testele bazate pe clasificare, cum ar fi testul Jonckheere-Terpstra pentru tendință (37) și testele Mann-Whitney (38) pentru comparații pe perechi cu grupul martor tratat cu vehicul/solvent, cât și testele de permutație, re-eșantionare sau de tip bootstrap pentru comparații ale tendințelor și pe perechi cu grupul martor (31) (39).

45. Un test LD pozitiv oferă dovezi privind genotoxicitatea substanței chimice de testat la celulele germinale ale masculilor tratați din specia de testat.

46. Analizarea problemei dacă valorile observate se situează în interiorul sau în afara intervalului martor istoric poate oferi îndrumări la evaluarea semnificației biologice a răspunsului (40).

Raport testului

47. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Sinteză.

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;

▼**M8**

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale), atunci când sunt realizate.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată și o justificare a alegerii acestora;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metoda de identificare unică a animalelor;

— pentru studii pe termen scurt: greutatea corporală a fiecărui mascul la începutul și la sfârșitul testului; pentru studii cu o durată mai mare de o săptămână: greutatea corporală individuală pe parcursul studiului și consumul de hrană. Ar trebui să fie inclus intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

— datele din studiul de stabilire a intervalului dozelor;

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— justificarea căii de administrare;

— metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;

— metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— detalii privind îmbogățirea mediului din captivitate;

— descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de eșantionare și justificările alegerilor;

— metoda de analgezie;

— metoda de eutanasiere;

▼**M8**

— proceduri pentru izolarea și păstrarea țesuturilor;

— sursa și numărul lotului pentru toate trusele și reactivii (după caz);

— metodele de enumerare a LD-urilor;

— programul de împerechere;

— metodele folosite pentru confirmarea împerecherii;

— momentul eutanasierii;

— criteriile de punctare a efectelor LD, inclusiv a corpurilor galbene, a implantărilor, a resorbțiilor și a pierderilor dinaintea implantării, a implanturilor vii și moarte.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata perioadei de testare, inclusiv semne de toxicitate;

— greutatea corporală masculină în timpul tratamentului și al perioadelor de împerechere;

— numărul de femele împerecheate;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— date concomitente și istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii și deviații standard;

— date concomitente privind martorii pozitivi;

— date sub formă de tabel pentru fiecare femelă gravidă, inclusiv: număr de corpuri galbene; număr de embrioni implantați; numărul de resorbții și pierderi înainte de implantare; număr de implanturi vii; număr de implanturi moarte; greutăți ale fetusului;

— datele de mai sus sintetizate pentru fiecare perioadă de împerechere și doză, cu frecvențele de letalitate dominantă;

— analize statistice și metode aplicate.

Discutarea rezultatelor.

Concluzie.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, în Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M. și Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Elaborat de către grupul de lucru „Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. și Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. și Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. și Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. și Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P. și Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. și Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. și Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J. și Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21-27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. și Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. și Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. și Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. și Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. și Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. și Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. și Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. și Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. și Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. și Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. și Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S. și Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. și Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J și Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. și Thybaud V. (2011). „Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. și Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. În *Encyclopedia of* Statistical Sciences, volumul 9, Kotz S. și Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. și Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, a patra ediție, capitolele 14 și 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Corp(uri) galben(e): structura hormonală secretoare formată pe ovar, în locul în care un folicul a eliberat oul. Numărul de corpuri galbene din ovare corespunde numărului de ouă care au fost produse.

Mutație cu letalitate dominantă: o mutație care apare într-o celulă germinală sau este fixată după fertilizare și care provoacă moartea embrionului sau a fătului.

Rată de fertilitate: numărul de femele gestante împerecheate pe numărul de femele împerecheate.

Interval de împerechere: intervalul de timp dintre sfârșitul expunerii și împerecherea masculilor tratați. Prin controlarea acestui interval se pot evalua efectele chimice asupra diferitelor tipuri de celule germinale. La împerecherea șoarecilor în săptămânile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 și 8, după sfârșitul expunerii, măsoară efectele produse la nivelul spermei, al spermatidelor condensate, al spermatidelor rotunde, al spermatocitelor pachitene, al spermatocitelor timpurii, al spermatocitelor diferențiate, cu diferențierea între spermatogonie și spermatogonia celulele stem.

Pierdere pre-implantare: diferența dintre numărul de implanturi și numărul de corpuri galbene. Acesta poate fi estimat, de asemenea, prin compararea implanturilor totale per femelă în grupul tratat și cel martor.

Pierdere post-implantare: raportul dintre implanturile moarte din grupul tratat comparativ cu raportul dintre implanturile moarte și cele totale la grupul martor.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice

▼**M8**

Apendicele 2

DURATA SPERMATOGENEZEI LA MAMIFERE

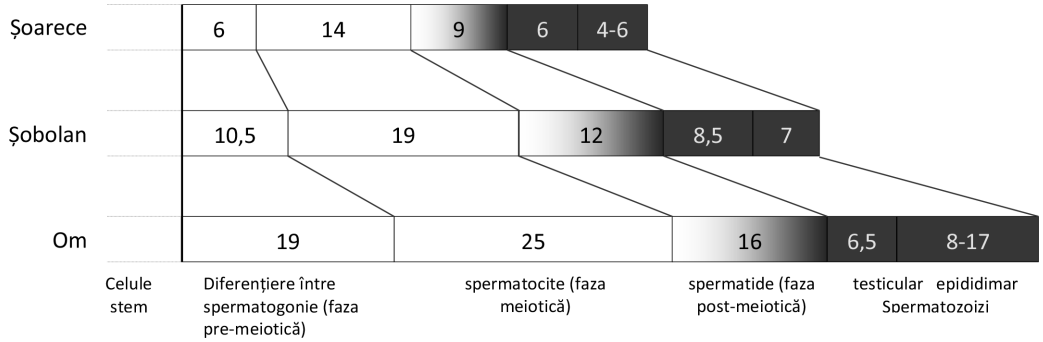


Fig. 1: Compararea duratei (în zile) a dezvoltării celulelor germinale masculine la șoareci, șobolani și la om. Repararea ADN-ului nu are loc în perioadele marcate prin nuanțare.

Mai sus este prezentată o schemă a spermatogenezei la șoarece, șobolan și om (preluată de la Adler, 1996). Printre spermatogoniile nediferențiate se numără: A-unice; A-perechi; și spermatogonii A-aliniate (Hess și de Franca, 2008). Spermatogonia A-unică este considerată a fi adevăratele celule stem; prin urmare, pentru evaluarea efectelor asupra celulelor stem, ar trebui să treacă cel puțin 49 zile (la șoarece) de la ultima injecție a substanței chimice de testat și împerechere.

Referințe

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. În: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

B.23. TEST DE ABERAȚIE CROMOZOMIALĂ PE SPERMATOGONII DE MAMIFERE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 483 privind testarea (TG) (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic în contextul progreselor științifice, al necesităților fluctuante de reglementare și al considerațiilor privind bunăstarea animalelor. Această versiune modificată a metodei de testare mulți ani de experiență în ceea ce privește acest test, precum și potențialul de a integra sau de a combina acest test cu alte studii de toxicitate sau de genotoxicitate; Combinarea studiilor de toxicitate are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în testele de toxicitate. Această metodă de testare face parte dintr-o serie de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (1).

2. Scopul testului *in vivo* de aberație cromozomială pe spermatogonii de mamifere constă în identificarea acelor substanțe chimice care produc aberații cromozomiale ale structurii în celulele spermatogoniale ale mamiferelor (2) (3) (4). În plus, acest test este relevant pentru evaluarea genotoxicității deoarece, în pofida faptului că aceștia pot să difere de la o specie la alta, factorii metabolismului *in vivo*, farmacocinetica și procesele de regenerare a ADN-ului sunt active și contribuie la răspunsuri. Această metodă de testare nu este concepută pentru a măsura anomaliile numerice; testul nu este utilizat în mod obișnuit în acest scop.

3. Acest test măsoară aberațiile cromozomiale structurale (tipul cromozom și cromatidă) la împărțirea celulelor germinale spermatogoniale și, prin urmare, se preconizează că va prezice inducția mutațiilor ereditare la aceste celule germinale.

4. Definițiile principalilor termeni sunt prevăzute în apendice.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. De regulă, se utilizează rozătoare în cadrul acestui test, însă, în unele cazuri, ar putea fi adecvată și utilizarea altor specii, dacă acest lucru este justificat din punct de vedere științific. Preparatele citogenetice standard din testiculele rozătoarelor produc metafaze mitotice (spermatogonii) și meiotice (spermatocite). Metafazele mitotice și meiotice sunt identificate pe baza morfologiei cromozomilor (4). Prezentul test citogenetic *in vivo* permite detectarea aberațiilor cromozomiale din mitozele spermatogoniale. Alte celule-țintă nu fac obiectul prezentei metode de testare.

6. Pentru detectarea aberațiilor de tip cromatidă din celulele spermatogoniale, ar trebui să se examineze prima diviziune celulară mitotică după tratament, înainte ca aceste aberații să fie transformate în aberații de tip cromozomial în cadrul diviziunilor celulare ulterioare. Informații suplimentare pot fi obținute din spermatocitele tratate prin analiza cromozomilor meiotici pentru aberații cromozomiale structurale în metafaza I și II a diachinezei.

▼M8

7. În testicul există un număr de generații de spermatogonii (5), iar aceste tipuri diferite de celule germinale pot avea un spectru de sensibilitate la tratamentul chimic. Astfel, aberațiile detectate reprezintă un răspuns agregat al populațiilor de celule spermatogoniale tratate. Majoritatea celulelor mitotice din preparatele pentru testicul sunt spermatogonii B, care au un ciclu celular de aproximativ 26 h (3).

8. În cazul în care există dovezi că substanța chimică testată sau metabolitul (metaboliții) acesteia nu va (vor) ajunge la testicul, utilizarea acestui test nu este adecvată.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

9. În general, animalele sunt expuse la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare și sunt eutanasiate la momentul corespunzător după tratament. Înainte de eutanasiere, animalele sunt tratate cu un agent de inhibare a metafazei (de exemplu, colchicină sau Colcemid®). Apoi, din celulele germinale, se realizează preparate cromozomiale care se colorează, iar celulele în metafază sunt analizate la microscop pentru detectarea aberațiilor cromozomiale.

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

10. Competența în cadrul acestui test ar trebui să fie stabilită prin demonstrarea capacității de a reproduce rezultatele preconizate pentru frecvențele aberațiilor cromozomiale structurale la spermatogonii cu substanțe martor pozitive (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, și obținerea de frecvențe ale martorului negativ care sunt consecvente cu o gamă acceptabilă de date despre martori din literatura publicată [de exemplu: (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] sau distribuția istorică a martorilor din laborator, dacă există.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

11. Ar trebui să se utilizeze sușe de laborator utilizate în mod curent, alegându-se animale adulte, tinere, sănătoase. De regulă, se utilizează șoareci masculi; însă, se pot utiliza masculi și din alte specii de mamifere adecvate, în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific și pentru a permite efectuarea acestui test în comun cu o altă metodă de testare. Justificarea științifică pentru utilizarea altor specii decât rozătoare ar trebui prezentată în raport.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

12. În cazul rozătoarelor, temperatura sălii în care se află animalele trebuie să fie de 22 °C (±3 °C). Cu toate că umiditatea relativă este, în mod ideal, de 50-60 %, aceasta trebuie să fie de cel puțin 40 % și să nu depășească, de preferință,70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul ar trebui să fie iluminat artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Rozătoarele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici (maximum cinci), în cazul în care nu se preconizează vreun comportament agresiv, de preferat în cuști solide la sol, cu o îmbogățire adecvată a mediului. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

▼M8

Pregătirea animalelor

13. Masculii adulți, tineri și sănătoși (cu vârsta de 8-12 săptămâni la începutul tratamentului) sunt utilizați, de regulă, și repartizați aleatoriu în grupurile de control și de tratament. Animalele se identifică în mod individual prin utilizarea unei metode umane, minim invazive (de exemplu, prin aplicarea de inele, crotaliere, microcipare sau identificare biometrică, dar nu prin secționarea urechii sau a degetului) și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de minimum cinci zile. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Ar trebui să se evite contaminarea încrucișată între martorul pozitiv și substanța chimică de testat. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte o variație minimă și să nu depășească ± 20 %.

Prepararea dozelor

14. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui dizolvate sau suspendate în solvenți sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apa potabilă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. În cazul expunerilor la inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Ar trebui să se utilizeze preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condițiile de depozitare corespunzătoare.

Condiții de testare - Solvent/vehicul

15. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozajele utilizate și nu ar trebui să reacționeze chimic cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei recunoscuți, includerea acestora ar trebui să fie justificată cu date de referință care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent/vehicul apos. Printre exemplele de solvenți/vehicule compatibili utilizați în mod obișnuit se numără apa, soluția fiziologică salină, soluția de metilceluloză, soluția de carboximetilceluloză sare de sodiu, uleiul de măsline și uleiul de porumb. În absența unor date anterioare sau publicate cu privire la martori care să ateste faptul că nicio aberație cromozomială de structură și alte efecte vătămătoare nu sunt induse de un anumit solvent/vehicul atipic, se efectuează un studiu inițial pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu solvent/vehicul.

Martori pozitivi

16. Ar trebui să se utilizeze întotdeauna, concomitent, animale ca martori pozitivi, cu excepția cazului în care laboratorul a demonstrat competență în efectuarea testului și a utilizat în mod curent testul în ultimii ani (de exemplu, în ultimii 5 ani). În cazul în care nu este inclus un grup de martori pozitivi testați în paralel, în fiecare experiment ar trebui să fie incluși martori examinați (lame fixate și necolorate). Acestea pot fi obținute prin includerea în sistemul de punctare a probelor de referință adecvate ale studiului care au fost obținute și păstrate dintr-un experiment separat pe martor pozitiv realizat periodic (de exemplu, la 6-18 luni) în laboratorul în care este efectuat testul; de exemplu, în timpul testării competențelor și, ulterior, în mod regulat, după caz.

17. Substanțele chimice martor pozitive ar trebui să producă în mod fiabil o creștere detectabilă a frecvențelor celulelor cu aberații cromozomiale structurale peste nivelurile spontane. Dozele de martor pozitiv ar trebui să fie alese astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără a releva imediat examinatorului identitatea probelor codate. Tabelul 1 include exemple de substanțe chimice martor pozitive.

▼M8

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive

Substanțe [nr. CAS] (nr. de referință)
Ciclofosfamidă (monohidrat) [nr. CAS 50-18-0 (nr. CAS 6055-19-2)] (9)
Ciclohexilamină [nr. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicină C [CAS nr. 50-07-7] (6)
Acrilamidă monomerică [79-06-1] (10)
Trietilenmelamină [nr. CAS 51-18-3]

Martori negativi

18. Animalele martori negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile de tratament, ar trebui să fie incluse în fiecare eșantionare. În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă aberații cromozomiale sau alte efecte vătămătoare, animalele martor netratate ar trebui să fie, de asemenea, incluse pentru fiecare moment de eșantionare, pentru a stabili acceptabilitatea martorului tratat cu vehicul.

PROCEDURA

Număr de animale

19. Dimensiunile grupului la începutul studiului ar trebui să fie stabilite cu scopul de a oferi minim 5 masculi pentru fiecare grup. Acest număr de animale pe grup este considerat a fi suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată (adică, în general, poate detecta cel puțin o dublare a frecvenței aberațiilor cromozomiale atunci când nivelul martorului negativ este de 1,0 % sau mai mare, cu o probabilitate de 80 % la un nivel de semnificație de 0,05) (3) (11). Ca o orientare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu efectuat la două eșantionări cu trei grupuri de dozaj și un grup martor negativ testat în paralel, la care se adaugă un grup martor pozitiv (fiecare grup alcătuit din cinci animale pe grup) ar necesita 45 de animale.

Schema de tratament

20. Substanțele chimice de testat sunt administrate, de obicei, o singură dată (și anume, un singur tratament); ar putea fi utilizate alte regimuri de dozaj, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

21. La grupa cu dozajul maxim, se utilizează două eșantionări după tratament. Întrucât timpul necesar pentru absorbția și metabolizarea substanței (substanțelor) chimice de testat, precum și acțiunea acesteia (acestora) asupra cineticii ciclului celular poate avea efecte asupra timpului optim pentru detectarea aberației cromozomiale, se utilizează o eșantionare târzie la aproximativ 24 și 48 de ore după tratament. Pentru doze diferite de cea mai mare doză, se stabilește un interval de eșantionare timpurie de 24 de ore (cel mult egal cu durata ciclului celular la spermatogonii B și, astfel, optimizând probabilitatea de a puncta primele metafazate de după tratament) după tratament, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul un alt interval de eșantionare ca fiind mai adecvat și justificat.

22. Se pot utiliza și alte eșantionări. De exemplu, în cazul substanțelor chimice care exercită efecte independente S, pot fi adecvate intervale de eșantionare timpurii (și anume, mai mici de 24 de ore).

▼M8

23. Se poate aplica un regim de tratament cu repetarea dozei, cum ar fi concomitent cu un test asupra unui alt punct final care utilizează o perioadă de administrare de 28 de zile (de exemplu, TM B.58); însă, ar fi necesare grupuri de animale suplimentare pentru încadrarea unor intervale de eșantionare diferite. În consecință, caracterul adecvat al unui astfel de program trebuie justificat științific de la caz la caz.

24. Înainte de eutanasiere, se procedează la injectarea intraperitoneală a animalelor cu o doză corespunzătoare de substanță chimică de inhibare a metafazei (de exemplu Colcemid® sau colchicină). Eșantionarea animalelor este efectuată apoi la un interval corespunzător. În cazul șoarecilor și al șobolanilor, acest interval este de aproximativ 3-5 ore.

Doze

25. În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor din cauza faptului că nu există date deja disponibile pentru a contribui la selectarea dozei, acesta este realizat în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă și regim de tratament care urmează să fie utilizate în studiul principal, în conformitate cu recomandările pentru realizarea de studii de stabilire a dozelor (12). Studiul ar trebui să aibă ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită ca doza care induce efecte toxice ușoare în raport cu durata perioadei de studiu (de exemplu, un comportament sau reacții anormale sau scăderea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitate în sistemul hematopoietic), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care necesită eutanasierea animalelor (13).

26. Doza maximă poate fi definită ca fiind doza care produce anumite semne de toxicitate la celulele spermatogoniale (de exemplu, o diminuare a proporției de mitoze spermatogoniale în raport cu prima și a doua metafază meiotică). Reducerea respectivă nu ar trebui să fie mai mare de 50 %.

27. Substanțele chimice de testat cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturarea proprietăților toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui să fie evaluate de la caz la caz.

28. Pentru a obține informații privind relația doză-răspuns, un studiu complet ar trebui să includă un grup martor negativ (punctul 18) și minim trei niveluri de dozare separate, în general, de un factor de 2, dar nu mai mare de 4. În cazul în care substanța chimică de testat nu produce toxicitate într-un studiu de stabilire a dozelor sau pe baza datelor existente, doza maximă pentru o singură administrare este de 2 000 mg/kg corp. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat provoacă toxicitate, DMT ar trebui să fie cea mai mare doză administrată, iar dozele utilizate ar trebui, de preferat, să acopere un interval de toxicitate de la doza maximă până la o doză care provoacă toxicitate minimă sau la care nu provoacă toxicitate. În cazul în care se observă toxicitate în țesutul țintă (și anume, în testicule) la toate dozele testate, se recomandă realizarea unui studiu suplimentar la doze netoxice. Studiile care au drept scop caracterizarea pe deplin a informațiilor cantitative doză-răspuns pot necesita grupuri suplimentare de dozare. Pentru anumite tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) reglementate prin cerințe specifice, aceste limite pot varia. În cazul în care substanța chimică de testat produce toxicitate, ar trebui să fie selectată doza-limită plus două doze mai mici (astfel cum este descris mai sus). Doza-limită pentru o perioadă de administrare de cel puțin 14 de zile este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, iar pentru perioade de administrare mai mici de 14 zile, doza-limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi.

▼M8

Administrarea dozelor

29. La conceperea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea sau implantarea pot fi alese ca fiind justificate. În orice caz, calea ar trebui să fie aleasă astfel încât să se asigure expunerea adecvată a țesutului-țintă. Injectarea intraperitoneală nu se recomandă, în mod normal, decât dacă aceasta este justificată din punct de vedere științific, întrucât aceasta nu este, de regulă, o cale relevantă de expunere umană din punct de vedere fiziologic. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată în amestec cu hrana sau apa potabilă, în special în cazul administrării unice, se acordă atenție deosebită intervalului dintre consumul de hrană și apă și eșantionare, care trebuie să fie suficient pentru a permite identificarea efectelor (a se vedea punctul 33). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură priză depinde de dimensiunea animalului de testare. De regulă, volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza maxim 2 ml/100 g greutate corporală. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă legislația privind bunăstarea animalelor permite acest lucru). Variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Observații

30. Se recomandă emiterea de observații clinice generale asupra animalelor de experiență și înregistrarea semnelor clinice cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. Toate animalele ar trebui să fie examinate cel puțin de două ori pe zi pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul studiului, cel puțin o dată pe săptămână în timpul studiilor cu doză repetată și la eutanasiere. În cadrul studiilor cu o durată de cel puțin o săptămână, ar trebui să se măsoare consumul de hrană cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, ar trebui să se măsoare consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă ar trebui să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (13).

Prepararea cromozomilor

31. Imediat după eutanasiere, se obțin suspensii de celule germinale din unul sau ambele testicule, care sunt expuse la o soluție hipotonică și se fixează conform protocoalelor instituite [de exemplu, (2) (14) (15)]. Celulele sunt apoi răspândite pe lamele și colorate (16) (17). Toate lamelele ar trebui să fie codificate, astfel încât identitatea lor să nu fie disponibilă factorului de punctare.

Analiză

32. Pentru fiecare animal ar trebui să fie punctate cel puțin 200 de metafaze bine stabilite (3) (11). În cazul în care frecvența martorilor negativi anteriori este < 1 %, ar trebui punctate peste 200 de celule/animal pentru a crește puterea statistică (3). Ar trebui utilizate metode de colorare care să permită identificarea centromerului.

33. Aberațiile de tip cromatidian și cromozomial ar trebui să fie înregistrate separat și clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi). Lacunele ar trebui înregistrate, dar nu luate în considerare atunci când se stabilește dacă o substanță chimică induce creșterea semnificativă a incidenței celulelor cu aberații cromozomiale. Procedurile utilizate în laborator ar trebui să asigure efectuarea analizei aberațiilor cromozomiale de către factori de punctare bine instruiți. Recunoscând faptul că metodele de preparare a

▼M8

lamelor conduc adesea la scindarea unei fracții de celule în metafază cu pierdere de cromozomi, toate celulele examinate ar trebui, prin urmare, să conțină un număr de centromeri nu mai mic de $2n \pm 2$, unde n este numărul haploid de cromozomi pentru specia respectivă.

34. Deși scopul testului este de a detecta aberațiile cromozomiale structurale, este important să se înregistreze frecvențele celulelor poliploide și ale celulelor cu cromozomi endoreduplicați atunci când se observă astfel de evenimente (a se vedea punctul 44).

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

35. Datele pentru fiecare animal ar trebui să fie prezentate sub formă de tabel. Pentru fiecare animal, ar trebui să se evalueze numărul de celule cu (o) aberație (aberații) cromozomială (cromozomiale) structurală (structurale) și numărul de aberații cromozomiale per celulă. Ar trebui să se întocmească separat o listă cu aberațiile de tip cromatidian și cromozomial clasificate în funcție de subtipuri (rupturi, schimburi), specificând numărul și frecvența acestora pentru culturile experimentale și cele martor. Lacunele sunt înregistrate separat. Se raportează frecvența lacunelor, dar, în general, aceasta nu se include în analiza frecvenței totale a aberațiilor cromozomiale structurale. Dacă se observă, se raportează procentul poliploidiei și al celulelor cu cromozomi endoreduplicați.

36. Ar trebui să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 30.

Criterii de acceptabilitate

37. Următoarele criterii determină acceptabilitatea unui test.

— Martorul negativ testat în paralel este în concordanță cu normele publicate referitoare la datele privind martorii negativi testați anterior, care sunt preconizate, în general, a fi > 0 % și $\leq 1{,}5$ % celule cu aberații cromozomiale, și datele anterioare ale laboratorului privind martorii, dacă sunt disponibile (a se vedea punctele 10 și 18).

— Martorii pozitivi testați în paralel induc răspunsuri consecvente cu normele publicate pentru datele privind martorii pozitivi testați anterior sau cu baza de date a laboratorului privind martorii pozitivi testați anterior, dacă sunt disponibile, și produc o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctele 17 și 18).

— Analizarea unui număr adecvat de celule și doze (a se vedea punctele 28 și 32).

— Criteriile pentru selecția dozei de vârf sunt în concordanță cu cele descrise la punctele 25 și 26.

38. Dacă se observă atât mitoză, cât și meioză, ar trebui să se stabilească rata mitozelor spermatogoniale în prima și a doua metafază meiotică, ca măsură a citotoxicității pentru toate animalele tratate și cele martor negative dintr-un eșantion total de 100 de celule divizoare pe animal. Dacă se constată doar mitoză, ar trebui să se determine indexul mitotic în cel puțin 1 000 de celule pentru fiecare animal.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

39. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, ar trebui să se analizeze cel puțin trei grupuri de doze tratate.

▼**M8**

40. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

— cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— creșterea este legată de doză cel puțin în cadrul unui interval de eșantionare; și,

— oricare dintre aceste rezultate se situează în afara intervalului acceptabil de date privind martorul negativ, sau a distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată capabilă să inducă aberații cromozomiale la celulele spermatogoniale ale animalelor de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (11) (18). Testele statistice utilizate ar trebui să considere animalul ca fiind unitatea experimentală.

41. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

— niciuna dintre dozele de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel;

— nu există o creștere legată de doză în nicio condiție experimentală; și,

— toate rezultatele se situează în intervalul acceptabil de date privind martorul negativ sau de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson), dacă există.

Apoi substanța chimică de testat este considerată incapabilă să inducă aberații cromozomiale la celulele spermatogoniale ale animalelor de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (11) (18). Un rezultat negativ nu exclude posibilitatea ca substanța chimică să inducă aberații cromozomiale în faze de dezvoltare ulterioare nestudiate, sau mutații genetice.

42. În cazul unui răspuns clar pozitiv sau clar negativ, nu există nicio cerință referitoare la verificare.

43. În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ sau pozitiv și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat (de exemplu, o creștere ușoară sau la limită), datele ar trebui evaluate în cadrul unei expertize și/sau al unor investigații suplimentare, folosind datele experimentale existente, cum ar fi analiza problemei dacă rezultatul pozitiv se situează în afara intervalului acceptabil al datelor privind martorii negativi sau al datelor istorice privind martorii negativi din laborator (19).

44. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, se va concluziona că acesta este echivoc.

45. O creștere a numărului de celule poliploide poate să indice faptul că substanța chimică de testat are potențialul de a inhiba procesele mitotice și să producă aberații cromozomiale numerice (20). O creștere a numărului de celule cu cromozomi endoreduplicați poate să indice faptul că substanța chimică de testat are potențialul de a inhiba evoluția ciclului celular (21) (22), care reprezintă un mecanism de inducere a modificărilor cromozomiale numerice diferit de inhibarea procesele mitotice (a se vedea punctul 2). Prin urmare, incidența celulelor poliploide și a celulelor cu cromozomi endoreduplicați ar trebui să se înregistreze separat.

▼M8

Raportul testului

46. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Sinteză.

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Prepararea substanței chimice de testat:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul;

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau a inhalărilor;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitate, omogenitate, concentrații nominale), atunci când sunt realizate.

Animale de testare:

— specia/sușă utilizată și justificarea utilizării;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— metoda de identificare unică a animalelor

— pentru studii pe termen scurt: greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului; pentru studii cu o durată mai mare de o săptămână: greutatea corporală individuală pe parcursul studiului și consumul de hrană. Ar trebui să fie inclus intervalul de greutate, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

▼**M8**

— datele din studiul de stabilire a dozelor, dacă s-a realizat;

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— justificarea căii de administrare;

— detalii privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— justificarea momentelor de sacrificare;

— metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;

— metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de eșantionare și justificările alegerilor;

— metoda de eutanasiere;

— metoda de analgezie (atunci când se utilizează);

— proceduri pentru izolarea țesuturilor;

— identitatea substanței chimice de inhibare a metafazei, concentrația acesteia și durata tratamentului;

— metodele de preparare a lamelor;

— criteriile pentru examinarea aberațiilor;

— numărul de celule analizate per animal;

— criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultate:

— starea animalelor înainte și pe toată durata perioadei de testare, inclusiv semne de toxicitate;

— greutățile corporale și ale organelor la sacrificare (dacă sunt utilizate tratamente multiple, greutățile corporale luate în timpul regimului de tratament);

— semnele de toxicitate;

— indexul mitotic;

— proporția de celule spermatogoniale în mitoză în prima și a doua metafază meiotică sau alte dovezi ale expunerii la țesutul țintă;

— tipul și numărul aberațiilor, consemnate separat pentru fiecare animal;

— numărul total de aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

▼M8

— numărul de celule cu aberații pentru fiecare grup împreună cu valoarea medie și deviațiile standard;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— analizele statistice și metodele aplicate;

— datele privind martorii negativi studiați în paralel;

— datele istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii, abateri standard și un interval de încredere de 95 % (dacă există) sau datele istorice privind martorii negativi publicate, care sunt utilizate pentru acceptabilitatea rezultatelor testului;

— date concomitente privind martorii pozitivi;

— variațiile ploidiei, dacă există, inclusiv frecvența celulelor poliploide și/sau enderoduplicate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. În: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt și J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. și Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. și de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. În: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. În: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. și Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M. și Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M. și Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼M8

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. și Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. și Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(14) Yamamoto, K. și Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. și Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G. și Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. și Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, în: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Partea I revizuită. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. și Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays În: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Raport, Partea III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. și Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. și Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. și Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Apendice

DEFINIȚII

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Centromer: regiune (regiuni) dintr-un cromozom care, în timpul diviziunii celulare, este (sunt) legată(e) de fibrele fusului, ceea ce permite deplasarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Diversitatea cromozomilor: diversitatea formelor cromozomiale (de exemplu, metacentrică, acrocentrică etc.) și dimensiuni.

Aberație de tip cromatidic: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura cromatidelor singure sau prin ruptura și alipirea între cromatide.

Aberație de tip cromozomial: o leziune structurală a cromozomului care se traduce prin ruptura sau ruptura și reuniunea ambelor cromatide în același loc.

Clastogen: orice substanță chimică care cauzează aberații cromozomiale structurale la populații de celule sau organisme.

Deficiență: leziune acromatică mai mică decât lățimea unei cromatide și cu o eroare minimă de aliniere a cromatidelor.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Indice mitotic (MI): raportul dintre numărul de celule în metafază și numărul total de celule observate într-o populație celulară; indică gradul de proliferare a populației respective.

Mitoză: divizarea nucleului celular, împărțită în general în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Anomalie numerică: modificare a numărului de cromozomi față de numărul normal caracteristic pentru animalele utilizate.

Poliploidie: multiplicare a numărului de cromozomi haploizi (*n*), alta decât diploidia (și anume 3*n*, 4*n* ș.a.m.d.).

Aberație structurală: modificare a structurii cromozomilor, detectabilă la examinarea microscopică a celulelor în stadiul de metafază al diviziunii acestora, care se prezintă sub formă de deleții și fragmente, modificări intracromozomiale și intercromozomiale.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice.

▼M7

▼B

B.25. **TRANSLOCAȚII EREDITARE LA ȘOARECI**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚIE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul translocației ereditare la șoareci decelează modificările cromozomiale structurale și numerice ale celulelor germinale de mamifere, apărute la descendenții din prima generație. Tipurile de modificări cromozomiale detectate sunt translocații reciproce și, dacă în experiment sunt incluși și descendenții femele din generația F_1, pierderea cromozomului X. Purtătorii de translocații și femelele XO prezintă fertilitate redusă care este folosită la selecția descendenților F_1 pentru efectuarea analizelor citogenetice. Sterilitatea completă este determinată de anumite tipuri de translocații (X-autozom și tipul c-t). Translocațiile se observă citogenetic în timpul celulele meiotice în diachineză-metafaza I la masculi, fie că sunt masculi F_1, fie descendenți masculi ai femelelor F_1. Femelele XO sunt identificate citogenetic prin prezența a doar 39 de cromozomi în mitozele măduvei osoase.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA TESTULUI

Pregătire

Substanțele chimice de testat se dizolvă în soluție izotonică salină. Dacă sunt insolubile în apă, se dizolvă sau se suspensionează într-un vehicul corespunzător. Se utilizează soluții proaspăt preparate ale compusului de testat. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu compusul de testat și nu trebuie să producă efecte toxice.

Calea de administrare

Calea de administrare obișnuită este intubarea orală sau injectarea intraperitoneală. Se pot folosi și alte căi de administrare.

Animale de experiență

Pentru a facilita reproducerea și verificarea citologică, aceste experimente se fac pe șoareci. Nu este necesară utilizarea anumitor linii de șoareci. Cu toate acestea, mărimea medie a seriei de pui din linia respectivă trebuie să fie în medie mai mare de opt și să fie relativ constant.

Se folosesc animale mature din punct de vedere sexual.

▼B

Numărul animalelor

Numărul de animale necesare depinde de frecvența apariției translocațiilor spontane și de rata minimă de inducție necesară pentru un rezultat pozitiv.

De obicei, testul se efectuează pe descendenții masculi F_1. Trebuie testați cel puțin 500 de descendenți masculi F_1 pe lot. Dacă experimentul include și descendenți femele F_1, sunt necesari 300 de masculi și 300 de femele.

Utilizarea martorilor negativi și pozitivi

Este necesar să fie disponibile date martor adecvate obținute din martori simultani și din martori istorici. Atunci când sunt disponibile rezultate acceptabile de la martorul pozitiv din alte experimente desfășurate recent în același laborator, acestea pot fi folosite în locul unui martor pozitiv simultan.

Doze

Se testează o singură doză, de obicei doza maximă asociată cu producerea de efecte toxice minime, dar care nu produce efecte asupra comportamentului de reproducere sau asupra supraviețuirii. Pentru stabilirea unei relații doză/răspuns sunt necesare încă două doze mai mici. În cazul expunerii la substanțe chimice netoxice, este necesar să se administreze doza maximă posibilă.

Mod de operare

Tratament și împerechere

Există două scheme de tratament. Administrarea în doză unică este cel mai des utilizată; se poate recurge și la administrarea substanței de testat șapte zile pe săptămână timp de 35 de zile. Numărul de împerecheri după efectuarea tratamentului depinde de schema de tratament și trebuie să asigure prelevarea de celule germinale tratate în toate stadiile. La sfârșitul perioadei de împerechere, femelele sunt plasate în cuști individuale. Când gestantele fată, se înregistrează data, mărimea seriei de pui și sexul descendenților. Toți puii masculi sunt înțărcați, iar femelele pui sunt eliminate, cu excepția cazului în care sunt incluse și ele în experiment.

Testarea heterozigoților de translocație

Se utilizează una din cele două metode posibile:

— testarea, prin analize citogenetice, a fertilității descendenței F_1 și verificarea ulterioară a eventualilor purtători de translocații prin analiză citogenetică;

— analiza citogenetică a tuturor descendenților masculi F_1 fără o selecție prealabilă prin testarea fertilității.

(a) Testarea fertilității

Fertilitatea redusă a unui descendent F_1 poate fi stabilită prin observații asupra mărimii seriei de pui și/sau prin analizarea conținutului uterin la femelele gestante.

Este necesar să se stabilească criteriile de determinare a fertilității normale sau reduse la linia de șoareci folosită.

▼B

Observații asupra mărimii seriei de pui: Masculii F_1 care urmează să fie testați sunt plasați în cuști individuale cu femele din același experiment sau din colonie. Cuștile se verifică zilnic începând cu a optsprezecea zi de la împerechere. La fătare se înregistrează mărimea seriei de pui și sexul descendenței F_2, după care puii sunt eliminați. Dacă se testează descendența feminină F_1, descendenții F_2 proveniți din serii mici de pui sunt păstrați pentru testări suplimentare. Toate femelele purtătoare de translocații sunt verificate prin analiza citogenetică a unei translocații la oricare din descendenții lor masculi. Femelele XO se recunosc prin schimbarea raportului între sexe masculi/femele la descendenții lor, de la 1:1 la 1:2. Într-o metodă secvențială, animalele F_1 normale nu fac obiectul unei alte verificări dacă prima serie de pui F_2 atinge sau depășește o valoare normală predeterminată, în caz contrar observându-se o a doua sau o a treia serie de pui F_2.

Animalele F_1 care nu pot fi clasificate ca normale după observațiile efectuate pe cel mult trei serii de pui F_2, sunt testate prin analiza conținutului uterin al femelelor gestante sau sunt supuse direct analizei citogenetice.

Analiza conținutului uterin: Reducerea mărimii seriei de pui în cazul purtătorilor de translocații se datorează morții embrionilor, astfel încât un număr mare de implanturi moarte reprezintă un indiciu al prezenței unei translocații la animalul testat. Fiecare mascul F_1 care urmează să fie testat este împerecheat cu două-trei femele. Momentul concepției se stabilește prin examinarea zilnică, dimineața, în vederea decelării prezenței dopului vaginal. Femelele se sacrifică în a 14-16-a zi de gestație, înregistrându-se apoi implanturile vii sau moarte din uterul fiecăreia.

(b) Analiză citogenetică

Preparatele testiculare se obțin prin tehnica uscării la aer. Purtătorii de translocații se identifică prin prezența configurațiilor multivalente la diachineză-metafaza I la nivelul spermatociților primari. Prezența a cel puțin două celule cu asociații multivalente constituie dovada necesară că animalul testat este purtătorul unei translocații.

Dacă nu s-a produs nicio selecție prin analiza reproducerii, toți masculii F_1 se examinează citogenetic. Se analizează microscopic cel puțin 25 de celule în faza de diachineză-metafaza I pentru fiecare mascul. Examinarea metafazei mitotice în spermatogonii sau în măduva osoasă este necesară la masculii F_1 cu testicule mici și rupere meiotică înainte de diachineză sau la femele F_1 suspecte de a fi XO. Prezența unui cromozom neobișnuit de lung și/sau scurt în fiecare a zecea celulă indică o translocație specială care induce sterilitatea masculului (tip c-t). Anumite translocații X-autozome care determină sterilitatea masculină pot fi identificate numai printr-o serie de analize ale benzilor de cromozomi mitotici. Prezența a 39 de cromozomi în toate cele 10 mitoze indică starea XO la o femelă.

2. **DATE**

Datele sunt prezentate sub formă de tabele.

Mărimea medie a seriei de pui și raportul numeric între sexe se înregistrează de la naștere până la înțărcare pentru fiecare perioadă de împerechere.

▼B

Pentru evaluarea fertilității animalelor F_1, se prezintă mărimea medie a seriei de pui pentru toate împerecherile normale și mărimea fiecărei serii de pui proveniți din animale F_1 purtătoare de translocații. Pentru examinarea conținutului uterin se specifică numărul mediu al implanturilor vii și moarte în împerecherile normale și numărul implanturilor vii și moarte pentru fiecare împerechere a purtătorilor de translocații F_1.

Pentru analiza citogenetică a diachineză-metafazei I, se înregistrează numărul tipurilor de configurații multivalente și numărul total de celule pentru fiecare purtător de translocații.

Pentru fiecare exemplar F_1 steril se raportează numărul total de împerecheri și durata perioadei de împerechere. Se fac analize citogenetice detaliate și se cântăresc testiculele.

Pentru femelele XO se specifică mărimea medie a seriei de pui, raportul numeric dintre sexe la descendența F_2 și rezultatele analizei citogenetice.

În cazul în care posibilii purtători de translocații F_1 sunt preselecționați în teste de fertilitate, tabelele trebuie să cuprindă informații despre numărul celor care sunt confirmați cu heterozigoți de translocație.

Se raportează, de asemenea, date referitoare la experimentele pe martorii pozitivi și negativi.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— linia de șoareci, vârsta animalelor, greutatea animalelor tratate;

— numărul animalelor parentale de fiecare sex din lotul tratat și din lotul martor;

— condițiile de testare, descrierea amănunțită a tratamentului, dozele, solvenții, schema de împerechere;

— numărul și sexul descendenților pentru fiecare femelă, numărul și sexul descendenților aleși pentru analiza de translocație;

— momentul și criteriile analizei de translocație;

— numărul și descrierea amănunțită a purtătorilor de translocații, inclusiv date privind reproducerea și conținutul uterin, după caz;

— metode citogenetice și detalii asupra analizei microscopice, preferabil cu imagini;

— evaluarea statistică;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

▼B

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

▼B

B.26. TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA ROZĂTOARE

1. METODĂ

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 408 (1998) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate ce pot fi antrenate de expunerea repetată pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțărcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare, și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la risc la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Această metodă de testare pune un accent suplimentar pe efectele neurologice și furnizează indicii despre efectele imunologice și de reproducere. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină numărul maxim posibil de informații. Studiul ar trebui să aibă în vedere identificarea substanțelor care au potențialul de a produce efecte neurotoxice sau imunologice ori efecte asupra organelor de reproducere, ceea ce ar justifica efectuarea în continuare a unor studii mai aprofundate.

A se vedea și introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

Doza: este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate raportată la unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu mg/kg) ori ca o concentrație constantă în alimentație (ppm).

Dozajul: este un termen general care cuprinde doza, frecvența acesteia și durata administrării.

DFEAO: este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: No Observable Adverse Effect Level) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt, de asemenea, sacrificate și autopsiate.

▼B

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale sănătoase, care au fost acomodate la condițiile de laborator timp de minimum 5 zile și nu au mai fost folosite în alte experiențe. Trebuie precizate specia, sușa, proveniența, sexul, greutatea și vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. Cuștile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

1.4.2. **Pregătirea dozelor**

Substanța testată se administrează prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau prin alimente ori apa de băut. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului și de proprietățile fizico-chimice ale substanței testate.

Acolo unde este necesar, substanța testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluții/suspensii apoase, urmată de o soluție/emulsie în ulei (de exemplu ulei de porumb) și în cele din urmă de o soluție în alți purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor alții decât apa. Se determină stabilitatea substanței testate în condițiile de administrare.

1.4.3. **Condițiile de testare**

1.4.3.1. *Animalele de laborator*

Specia preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Este recomandabil să se folosească animale adulte tinere, sănătoase, provenind din sușe de laborator obișnuite. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie însărcinate. Administrarea începe cât mai curând posibil după înțărcare și în niciun caz mai târziu de vârsta de nouă săptămâni. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite trebuie să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex. Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeași suș și din aceeași sursă.

1.4.3.2. *Numărul și sexul animalelor*

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate pentru sacrificare înainte de sfârșitul studiului. Pe baza cunoștințelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de 10 animale (5 de fiecare sex) în grupul martor și în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistența oricărui efect toxic. Durata perioadei post-tratament se fixează în funcție de efectele observate.

▼B

1.4.3.3. *Doze*

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri și există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori-limită (a se vedea punctul 1.4.3.4). Nivelul dozelor este stabilit în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare și iau în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța testată sau substanțe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăților fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanței, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu și moartea sau suferința severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns și nivelul dozei, precum și nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedește că la formarea seriei descrescătoare a dozelor este optimă progresia geometrică cu rația 2-4 și deseori adăugarea unui al patrulea grup de probă este preferabil folosirii unor rații foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtător, dacă se folosește un purtător la administrarea substanței testate. Cu excepția substanței testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile de probă. Dacă se folosește un purtător, grupul martor primește purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanța testată se administrează în alimente și provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea se datorează modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice și efectele asupra consumului de hrană sau apă ori asupra stării de nutriție a animalelor.

1.4.3.4. *Testul-limită*

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodologia descrisă pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile și toxicitatea nu este de așteptat în baza datelor existente pentru substanțele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori-limită este aplicabil cu excepția cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța testată zilnic, șapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanța testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, cu excepția soluțiilor apoase, când se pot folosi 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obișnuit efecte exacerbate la concentrații mai mari, este recomandabil ca variațiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentrația astfel încât să se asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

▼B

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente, se folosește fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul folosirii sondei, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

1.5.2. **Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observație ulterioară trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele se consemnează cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele urmărite cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu: lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și reacție la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu automutilarea, mersul înapoi) (1).

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor dar cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor, toate animalele trebuie examinate.

Spre sfârșitul perioadei de expunere și în orice caz nu înainte de săptămâna 11, se evaluează reactivitatea senzorială la diferite tipuri de stimuli (1) (de exemplu stimuli auditivi, vizuali, proprioceptivi) (2) (3) (4), se evaluează forța de apucare (5) și activitatea motorie (6). Detalii suplimentare referitoare la metodele utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Se pot folosi și metode diferite de cele menționate.

Observațiile funcționale pot fi omise spre sfârșitul studiului atunci când sunt disponibile date despre observațiile funcționale din alte studii și observațiile clinice zilnice nu au evidențiat deficite funcționale.

▼B

În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupurile care, pe de altă parte, prezintă simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar interfera semnificativ cu desfășurarea testului funcțional.

1.5.2.1. *Greutatea corporală și consumul de hrană/apă*

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanță testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

1.5.2.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La sfârșitul perioadei de testare, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

La sfârșitul perioadei de testare și atunci când se colectează probe de sânge pe parcurs, se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, numărătoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, numărătoarea plachetelor sangvine, măsurarea timpului de coagulare.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la fiecare animal imediat înainte de sacrificare sau ca parte a acestei proceduri (dar nu de la cele găsite muribunde sau care au fost sacrificate pe parcurs). Ca și la investigațiile hematologice, se pot recolta pe parcurs probe pentru analize de biochimie chimică. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană în timpul nopții dinainte de recoltare ([1]). Analizele de plasmă sau ser cuprind sodiu, potasiu, glucoză, colesterol total, uree, acid uric în sânge, creatinină, proteine și albumine totale și mai mult de două enzime indicând efectele hepatocelulare (ca alaninaminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gamaglutamiltranspeptidaza și sorbitol dehidrogenaza). Pot fi incluse și măsurători ale altor enzime (hepatice sau de altă origine) și ale acizilor biliari, care pot furniza informații utile în anumite situații.

Opțional, pot fi efectuate următoarele analize de urină în ultima săptămână a studiului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Dacă proprietățile cunoscute ale substanței testate pot sau se apreciază că pot să afecteze curbele metabolice conexe, trebuie efectuate și alte analize, cum sunt: calciu, fosfor, trigliceride à jeun, hormoni specifici, methemoglobină și colinesterază. Acestea trebuie identificate pentru substanțele chimice din anumite clase sau de la caz la caz.

([1]) Pentru mai multe analize de ser și plasmă, în special pentru glucoză, este de preferat absența hranei în timpul nopții. Cel mai important motiv este că variația crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efectele mai subtile și ar face dificilă interpretarea. Pe de altă parte însă, lipsa hranei pe durata nopții poate să interfereze cu metabolismul general al animalelor și riscă, în special în studiile în care substanța testată este administrată în alimente, să perturbe expunerea zilnică la această substanță. Dacă se optează pentru lipsa hranei pe timpul nopții, trebuie efectuate analize de biochimie clinică după observațiile funcționale ale studiului.

▼B

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

Dacă datele istorice de referință sunt insuficiente, este cazul să se ia în considerare necesitatea de a determina variabilele hematologice și de biochimie clinică înainte de începerea administrării; în general, nu se recomandă ca aceste date să se obțină înaintea tratamentului (7).

1.5.2.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, uterul, ovarele, timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

Țesuturile următoare se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii (conservați prin exces de fixativ și apoi imersie) aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, vezica biliară (șoarece), ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și o puncție aspirativă de măduvă osoasă examinată pe loc), piele și ochi (dacă s-au constat modificări la examenele oftalmologice). Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

1.5.2.5. *Se examinează toate leziunile macroscopice*

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

▼B

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Datele se prezintă individual. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, inclusiv momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

2.2. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde următoarele informații:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— datele de identificare chimică;

— purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.

2.2.2. **Animalele de laborator:**

— specia și sușa folosite;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea individuală a animalelor la începutul testului.

2.2.3. **Condițiile de testare:**

— motivația alegerii dozelor;

— detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței testate;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrația în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

2.2.4. **Rezultatele:**

— greutatea corporală și modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;

▼B

— natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu);

— rezultatele examenului oftalmologic;

— activitatea senzorială, forța de apucare, aprecierea activității motorii (dacă sunt disponibile);

— valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare;

— valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;

— greutatea corporală la moartea animalului, greutățile organelor interne, raporturile dintre greutatea organului intern și greutatea corporală;

— constatările de la autopsie;

— o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— date privind absorbția, dacă sunt disponibile;

— prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

2. Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

3. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

4. Moser, V. C., Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

5. Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C., Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

6. Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C., Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

7. Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. **TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ SUBCRONICĂ STUDIU DE 90 DE ZILE DE TOXICITATE ORALĂ CU DOZĂ REPETATĂ LA NEROZĂTOARE**

1. **METODĂ**

Această metodă de testare a toxicității orale subcronice reproduce Orientarea 409 (1998) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

La aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale unui produs chimic, determinarea toxicității orale subcronice folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate acută sau teste de toxicitate de 28 de zile cu doză repetată. Studiul de 90 de zile furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată la risc pe o perioadă îndelungată, care se extinde de la înțărcare până la vârsta adultă. Studiul furnizează informații asupra efectelor toxice majore, indicând organele-țintă și posibilitatea de acumulare și poate furniza și o estimare a nivelului de expunere la care nu se observă efecte adverse, care poate fi folosită în alegerea dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii la risc a oamenilor.

Metoda are în vedere identificarea la speciile nerozătoare a efectelor adverse ale expunerii chimice și se folosește doar:

— în cazul în care efectele observate în alte studii indică necesitatea unei clarificări/caracterizări cu ajutorul unei a doua specii, nerozătoare; sau

— în cazul în care studiile toxico-cinetice indică faptul că folosirea unei anumite specii nerozătoare reprezintă cea mai relevantă alegere a animalului de laborator; sau

— în cazul în care alte anumite motive justifică folosirea unei specii nerozătoare.

A se vedea și introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

Doză: este cantitatea de substanță testată administrată. Doza este exprimată ca greutate (g, mg) sau ca greutatea substanței testate pe unitatea de greutate a animalului de laborator (de exemplu mg/kg) sau în concentrații constante în alimentație (ppm).

Dozaj: este un termen general care cuprinde doza, frecvența acesteia și durata administrării.

DFEAO: este abrevierea pentru „doza fără efecte adverse observabile” (NOAEL: *No Observable Adverse Effect Level*) și reprezintă doza maximă la care nu s-au constatat stări adverse legate de tratament.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Diferite doze din substanța testată se administrează zilnic, pe cale orală, câtorva grupuri de animale de laborator, nivelul dozei fiind același pentru un grup, timp de 90 de zile. În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în timpul testului sunt autopsiate și la sfârșitul testului animalele supraviețuitoare sunt, de asemenea, sacrificate și autopsiate.

▼B

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Alegerea speciei de animale**

Specia nerozătoare folosită în mod obişnuit este câinele, care trebuie să fie de rasă definită; frecvent este folosit basetul. Pot fi folosite şi alte specii, de exemplu porcul sau porcul pitic. Nu se recomandă primatele, iar folosirea lor trebuie justificată. Trebuie folosite animale tinere şi sănătoase, iar în cazul câinelui administrarea trebuie să înceapă de preferinţă la vârsta de 4-6 luni şi nu mai târziu de vârsta de nouă luni. Atunci când studiul este efectuat în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, în ambele studii trebuie folosite animale din aceeaşi specie/rasă.

1.4.2. **Pregătirea animalelor**

Trebuie folosite animale tinere şi sănătoase, care au fost acomodate la condiţiile de laborator şi care nu au mai fost folosite în alte experienţe. Durata aclimatizării depinde de specia aleasă şi de proveniența sa. Se recomandă cel puţin cinci zile pentru câini sau pentru porci hrăniţi anume în acest scop în colonia laboratorului şi cel puţin două săptămâni pentru aceleaşi animale din surse externe. Trebuie precizate specia, suşa, proveniența, sexul, greutatea şi vârsta. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate şi grupurile martor. Cuştile se amplasează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate modului lor de dispunere. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic.

1.4.3. **Pregătirea dozelor**

Substanţa testată se administrează în alimente sau în apa de băut ori prin introducerea în stomac cu ajutorul unei sonde sau în capsule. Metoda de administrare pe cale orală depinde de scopul studiului şi de proprietăţile fizico-chimice ale substanţei testate.

Acolo unde este necesar, substanţa testată se dizolvă sau se trece în suspensie într-un purtător adecvat. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia mai întâi în considerare folosirea unei soluţii/suspensii apoase, urmată de o soluţie/emulsie în ulei (de exemplu ulei de porumb) şi în cele din urmă de o soluţie în alţi purtători. Trebuie cunoscute caracteristicile de toxicitate ale purtătorilor, alţii decât apa. Trebuie determinată stabilitatea substanţei testate în condiţiile de administrare.

1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Numărul şi sexul animalelor**

La fiecare nivel al dozei se folosesc cel puţin opt animale (patru femele şi patru masculi). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs, numărul trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de sfârşitul testului. Numărul animalelor la încheierea studiului trebuie să fie adecvat pentru ca evaluarea efectelor toxice să aibă semnificaţie. Pe baza cunoştinţelor existente despre produsul chimic sau un produs foarte asemănător, ar trebui să se ia în considerare includerea unui grup satelit suplimentar de opt animale (patru de fiecare sex) în grupul martor şi în grupul tratat cu doza cea mai puternică, pentru a observa, după tratament, reversibilitatea sau persistenţa oricărui efect toxic. Durata perioadei post-tratament se fixează în funcţie de efectele observate.

▼B

1.5.2. **Dozajul**

Dozele folosite sunt la minimum trei niveluri şi există un grup martor, în afara cazului în care se face un test la valori-limită (a se vedea 1.5.3). Nivelul dozelor se stabileşte în funcţie de rezultatele studiilor cu doză repetată sau ale studiilor preliminare şi ia în considerare orice date toxicologice şi toxico-cinetice disponibile pentru substanţa testată sau substanţe înrudite. Dacă nu există limitări datorate proprietăţilor fizico-chimice sau efectelor biologice ale substanţei, este recomandabil să se aleagă doza maximă care induce efectul toxic, dar nu şi moartea sau suferinţa severă. Se alege o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra legătura între răspuns şi nivelul dozei precum şi nivelul dozei fără efecte adverse observabile (DFEAO), în cazul celei mai mici doze. În mod frecvent, se dovedeşte că, la formarea seriei descrescătoare a dozelor, este optimă progresia geometrică cu raţia 2-4 şi deseori adăugarea unui al patrulea grup de testare este preferabil folosirii unor raţii foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze.

Grupul martor este un grup netratat sau tratat cu purtătorul, dacă se foloseşte un purtător la administrarea substanţei testate. Cu excepţia substanţei testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se foloseşte un purtător, grupul martor primeşte purtătorul în cantitatea maximă folosită. Dacă substanţa testată se administrează în alimente şi provoacă reducerea apetitului, un grup martor hrănit în paralel se poate dovedi folositor pentru a determina dacă reducerea de datorează modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor sau alterărilor toxicologice din organismul animalelor de laborator.

Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale purtătorului şi ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbţiei, circulaţiei, metabolizării sau retenţiei substanţei testate; efectele asupra proprietăţilor chimice ale substanţei testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice; şi efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării de nutriţie a animalelor.

1.5.3. **Testul la valori-limită**

Dacă testul efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puţin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodele de testare descrise pentru acest studiu, nu produce efecte adverse observabile şi dacă toxicitatea nu este de aşteptat în baza datelor existente pentru substanţele înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Testul la valori-limită este aplicabil cu excepţia cazului în care expunerea oamenilor arată că este necesară folosirea unei doze mai mari.

1.5.4. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanţa testată zilnic, şapte zile în fiecare săptămână, pentru o perioadă de 90 de zile. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. Când substanţa testată se administrează cu ajutorul sondei introduse în stomac, se administrează toată doza o dată fiecărui animal, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de mărimea animalului de laborator. În mod normal, volumul trebuie menţinut cât mai scăzut posibil. Cu excepţia substanţelor iritante sau corozive, care provoacă în mod obişnuit efecte exacerbate la concentraţii mai mari, este recomandabil ca variaţiile în volumul probei să fie reduse la minimum, ajustându-se concentraţia astfel încât să asigure un volum constant, indiferent de nivelul dozei.

▼B

Pentru substanțele administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Când substanța testată este administrată în alimente se poate folosi fie o concentrație constantă în alimente (ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului; alternativa folosită trebuie specificată. În cazul administrării prin sondă sau în capsulă, doza trebuie administrată aproximativ în același moment al zilei și ajustată după necesități, pentru a rămâne constantă în raport cu greutatea corporală a animalului. Atunci când un studiu de 90 de zile este folosit în preliminariile unui studiu pe termen lung de toxicitate cronică, se recomandă folosirea unei alimentații asemănătoare în ambele studii.

1.5.5. **Observațiile**

Perioada de observație se recomandă să fie de minimum 90 de zile. Animalele din grupul satelit programat pentru observații ulterioare trebuie să nu primească tratament o perioadă adecvată, pentru a detecta persistența sau reversibilitatea efectelor toxice.

Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Se recomandă înregistrarea stării clinice a animalelor. Cel puțin de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, toate animalele sunt examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate.

Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și apoi o dată pe săptămână. Aceste examene se recomandă să fie făcute, dacă e posibil, în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Trebuie acționat astfel încât variația condițiilor de observare să fie minimă. Simptomele de toxicitate trebuie să fie consemnate cu atenție, incluzând ora apariției, gradul și durata acestora. Observațiile cuprind, fără a se limita la ele, schimbări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, frecvența secrețiilor și a excrețiilor, ca și activitatea reflexă (de exemplu: lăcrimarea, erecția piloasă, modificarea pupilelor, respirația anormală). Este recomandabil să fie observate, de asemenea, schimbările în mers, ținută și reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare.

Examinarea oftalmologică, cu un oftalmoscop sau un aparat echivalent adecvat, de preferat a tuturor animalelor și cel puțin a animalelor din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor, trebuie efectuată înainte de administrarea substanței testate și la încheierea studiului. Dacă se constată modificări ale ochilor legate de tratament, toate animalele trebuie examinate.

1.5.5.1. *Greutatea corporală și consumul de hrană/apă*

Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. Dacă substanța testată se administrează în apa de băut, se măsoară și apa de băut cel puțin săptămânal. Este recomandabil să se măsoare consumul de apă și în studiile cu substanța testată administrată în alimente sau prin sondă, atunci când băutul apei poate suferi modificări.

▼B

1.5.5.2. *Hematologia și biochimia clinică*

Se prelevează probe de sânge din puncte determinate și se conservă, dacă este cazul, în condiții adecvate. La încheierea testului, probele se colectează imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri.

Se procedează la următoarele examene hematologice: hematocrit, concentrație de hemoglobină, numărătoarea eritrocitelor și a leucocitelor, formula leucocitară, numărătoarea plachetelor sangvine și o măsurare a potențialului de coagulare, cum sunt timpul de coagulare, timpul de protrombină sau de tromboplastină, la începutul studiului și apoi la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și, în cele din urmă, la încheierea testului.

Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la toate animalele la începutul studiului, la intervale lunare sau la jumătatea perioadei de testare și la încheierea testului. Domeniile de analiză care trebuie luate în considerare sunt balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților și funcțiile hepatică și renală. Alegerea analizelor specifice este influențată de observațiile asupra modului de acțiune a substanței testate. Se recomandă ca animalele să nu primească hrană pentru o perioadă adecvată speciei înainte de prelevarea probei de sânge. Analizele recomandabile cuprind măsurarea următoarelor: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoză à jeun, alaninaminotransferază, aspartat aminotransferază, ornitin decarboxilază, gamaglutamiltranspeptidază, acid uric, albumină, creatinină sangvină, bilirubină totală și proteine serice totale.

Analizele de urină trebuie efectuate cel puțin la început, apoi la jumătatea perioadei și la încheierea testului, folosind probe de urină prelevate după un anumit orar. Analizele cuprind: aspect, volum, osmolaritate sau densitate, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie. Se pot folosi și alți parametri dacă este necesar să se extindă investigarea efectului (efectelor) observat(e).

În plus, trebuie avute în vedere investigații asupra constantelor plasmatice ale leziunilor generale ale țesuturilor. Alte analize care se pot dovedi necesare pentru o evaluare toxicologică adecvată includ: analiza lipidelor, a hormonilor, echilibrul acido-bazic, methemoglobina și inhibarea colinesterazei. Pot fi folosite analize de biochimie clinică suplimentare, dacă este necesar să se extindă investigarea efectelor observate. Acestea trebuie identificate pentru substanțele din anumite clase sau de la caz la caz.

În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de specii și de efectele constatate și scontate ale substanței în cauză.

1.5.5.3. *Autopsia*

Toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale, testiculele, epididimul, ovarele, uterul, glanda tiroidă (cu glandele paratiroide) timusul, splina, creierul și inima fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

▼B

Țesuturile următoare trebuie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut: toate organele prezentând leziuni macroscopice, creierul (regiunile reprezentative, cuprinzând encefalul, cerebelul și trunchiul cerebral), măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar), hipofiza, ochii, glanda tiroidă, glandele paratiroide, timusul, esofagul, glandele salivare, stomacul, intestinul subțire și intestinul gros (inclusiv plăcile lui Peyer), ficatul, vezica biliară, pancreasul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, traheea și plămânii, aorta, gonadele, uterul, organele genitale anexe, glanda mamară feminină, prostata, vezica urinară, ganglionii limfatici (de preferință un ganglion limfatic din zona afectată de calea de administrare și un alt ganglion limfatic din altă zonă, aflată la distanță, pentru a detecta eventualele efecte sistemice), nervii periferici (sciatic sau tibial), de preferat din apropierea mușchiului, o probă de măduvă osoasă (și o puncție aspirativă de măduvă osoasă examinată pe loc), piele. Observațiile clinice și cele macroscopice pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute.

1.5.5.4. *Histopatologia*

Se efectuează un examen histopatologic complet al țesuturilor și organelor conservate ale tuturor animalelor aparținând grupului martor și grupului tratat cu doza cea mai mare. Aceste examene trebuie extinse la animalele tratate cu alte doze, dacă se constată modificări care au legătură cu tratamentul la grupul tratat cu doza cea mai mare.

Se examinează toate leziunile macroscopice.

Atunci când se folosește un grup satelit, se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Datele se prezintă individual. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umanitare și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune.

Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de redactare a protocolului de testare.

2.2. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare cuprinde următoarele informații:

▼B

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— datele de identificare chimică;

— purtătorul (dacă este cazul); justificarea alegerii purtătorului dacă este altul decât apa.

2.2.2. **Animalele de laborator:**

— specia și sușa folosite;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea individuală a animalelor la începutul testului.

2.2.3. **Condițiile de testare:**

— motivația alegerii dozelor;

— detalii privind preparatul hrană/rețeta substanței testate, concentrația realizată, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței testate;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa de băut (ppm) în doza reală, dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

2.2.4. **Rezultatele:**

— greutatea corporală și modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— rezultate privind reacția toxică, pe sexe și nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate;

— natura, severitatea și durata efectelor observate clinic (reversibile sau nu);

— rezultatele examenului oftalmologic;

— valorile hematologice și valorile de referință corespunzătoare;

— valorile de biochimie clinică și valorile de referință corespunzătoare;

— greutatea corporală la moartea animalului, greutățile organelor interne, raporturile greutatea organului intern/greutate corporală;

— constatările de la autopsie;

— o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— date referitoare la absorbție, dacă e cazul;

— prelucrarea statistică a rezultatelor, unde este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

▼B

B.28. **STUDIU DE TOXICITATE SUBCRONICĂ – ADMINISTRARE CUTANATĂ EXPERIMENT EFECTUAT TIMP DE 90 DE ZILE ASUPRA UNOR ROZĂTOARE**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

A se vedea introducerea generală partea B.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu sunt specificate.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se aplică zilnic substanța de testat pe cale cutanată, în concentrații crescătoare, mai multor loturi de testare, fiind administrată o doză pe lot timp de 90 de zile. Pe parcursul perioadei de aplicare, se observă zilnic animalele pentru a pune în evidență simptomele de toxicitate. Animalele care mor în timpul testului, precum și cele care supraviețuiesc la sfârșitul testului sunt supuse autopsiei.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Pregătiri**

Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului în cel puțin cele 5 zile care îl preced. Înainte de începerea testului, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Cu puțin timp înainte de test, se tunde blana din regiunea dorsală a animalelor. Se poate recurge la radere, dar în acest caz operația se efectuează cu aproximativ 24 de ore înainte de test. În timpul tunderii sau al raderii, trebuie evitată orice lezare a pielii. Suprafața care se degajează în vederea aplicării substanței nu trebuie să fie mai mică de 10 % din suprafața corporală. Pentru a decide zona care trebuie degajată și dimensiunile suprafeței care trebuie tratată, se ia în calcul greutatea animalului. Dacă testul vizează substanțele solide care, după caz, se pot pulveriza, substanța de testat trebuie umezită cu ajutorul apei sau, la nevoie, al unui vehicul adecvat, astfel încât să se poată obține un bun contact cu pielea. Substanțele de testat lichide se folosesc în general în stare nediluată. Se efectuează o aplicare zilnică timp de cinci până la șapte zile pe săptămână.

1.6.2. *Condiții de testare*

1.6.2.1. Animale de experiență

Animalele de laborator utilizate sunt șobolanul, iepurele sau cobaiul adult. Pot fi folosite și alte specii, dar folosirea lor trebuie justificată. La începutul experimentului, diferența de greutate între animale nu trebuie să depășească cu mai mult de ± 20 % valoarea medie. Când studiul de toxicitate subcronică prin administrare cutanată este efectuat ca fază preliminară a unui studiu pe termen lung, trebuie să se folosească aceeași specie și linie pentru ambele studii.

▼B

1.6.2.2. Număr și sex

Se folosesc, pentru fiecare doză, cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) a căror piele este sănătoasă. Femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul experimentului, acest număr se adaugă la total. În plus, se poate trata un lot satelit de 20 de animale (10 din fiecare sex) la doza cea mai mare timp de 90 de zile, care poate fi supus observației cu privire la reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor toxice pe parcursul celor 28 zile care urmează tratamentului.

1.6.2.3. Doze

Se folosesc cel puțin trei doze, precum și un lot martor sau, după caz, un lot martor pentru vehicul. Perioada de expunere este de cel puțin 6 ore pe zi. Se aplică substanța de testat în fiecare zi în același moment, iar dozele trebuie să facă obiectul unei adaptări (săptămânale sau bisăptămânale) pentru a menține constant nivelul dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din lotul martor se tratează în același mod ca și subiecții din loturile tratate. Dacă se folosește un vehicul pentru a facilita administrarea dozei, acesta este administrat lotului martor în aceleași condiții ca și pentru loturile tratate, iar doza administrată corespunde cu cea primită de lotul tratat cu doza maximă. Doza maximă trebuie să producă efecte toxice, dar nu trebuie să provoace sau trebuie să provoace rar moartea. Doza minimă nu trebuie să provoace niciun efect toxic. Dacă există informații privind expunerea umană, doza minimă trebuie să fie superioară acestei valori. În condiții ideale, doza intermediară trebuie să producă efecte toxice minime observabile. Dacă se folosesc mai multe doze intermediare, acestea se administrează eșalonat, astfel încât să provoace o gradare a efectelor toxice. În loturile care corespund dozelor mici și intermediare, precum și în loturile martor, incidența mortalității trebuie să fie mică, pentru a permite o evaluare semnificativă a rezultatelor.

Dacă aplicarea substanței de testat provoacă o iritație cutanată gravă, se reduc concentrațiile; aceasta poate avea ca efect diminuarea, chiar dispariția, celorlalte efecte toxice la doza mare. În plus, dacă leziunile cutanate sunt foarte grave, poate fi necesară oprirea experimentului și inițierea unui studiu nou, la concentrații mai mici.

1.6.3. Test-limită

Dacă în urma unei experiențe preliminare realizate cu o doză de 1 000 miligrame pe kilogram sau o doză mai mare în funcție de expunerea umană posibilă, când se cunoaște această valoare, nu apare niciun efect toxic, continuarea experienței poate fi inutilă.

1.6.4. Perioada de observație

Se observă toate animalele zilnic în vederea notării simptomelor de toxicitate. Se consemnează momentul morții și momentul când apar și dispar simptomele de toxicitate.

▼B

1.6.5. Mod de operare

Se pun animalele în cuști individuale. În condiții ideale, substanța de testat se administrează animalelor șapte zile pe săptămână timp de 90 de zile.

Animalele din toate loturile satelit destinate observației ulterioare sunt menținute în viață timp de încă 28 zile, fără tratament, în vederea constatării vindecării sau a persistenței efectelor toxice. Durata de expunere este de minimum șase ore pe zi.

Substanța de testat se aplică pe o suprafață aproximativ egală cu 10 % din suprafața totală a corpului. În cazul substanțelor foarte toxice, suprafața tratată poate fi mai mică, dar stratul trebuie să fie cât mai subțire și mai uniform posibil.

Pe parcursul expunerii, substanța de testat se menține în contact cu pielea cu ajutorul unui pansament de tifon și al unui plasture neiritant. Suprafața tratată se acoperă astfel încât să mențină pansamentul de tifon și substanța de testat și să se evite ingerarea acesteia de către animale. Se poate folosi contenționarea pentru a împiedica animalele să ingereze substanța de testat, dar nu se recomandă imobilizarea completă.

La sfârșitul perioadei de expunere, se elimină, dacă este posibil, orice reziduu de substanță, cu apă sau cu ajutorul unui alt procedeu de curățare a pielii.

Se observă zilnic toate animalele și se înregistrează simptomele de toxicitate, precum și momentul apariției, intensitatea și durata acestora. Observația zilnică vizează, între altele, modificări ale părului și ale blănii, ale ochilor și ale mucoaselor, ale aparatului respirator, ale sistemului circulator, ale sistemului nervos autonom și central, precum și ale activității somato-motrice și ale comportamentului. Se determină săptămânal greutatea animalelor. Se recomandă, de asemenea, măsurarea săptămânală a consumului de hrană. Animalele sunt observate cu regularitate pentru a evita, pe cât posibil, pierderea lor din motive exterioare experimentului, cum ar fi: canibalism, autoliză a țesuturilor sau greșeală de plasare a exemplarelor. La sfârșitul experimentului, se supun autopsiei toate animalele supraviețuitoare care aparțin loturilor nesatelit tratate. Animalele muribunde se scot imediat și se supun autopsiei.

Examinările următoare se efectuează de regulă asupra tuturor animalelor, inclusiv asupra martorilor:

(a) examenul oftalmologic, folosind un oftalmoscop sau un instrument echivalent corespunzător, trebuie făcut înainte de administrarea substanței de testat și la terminarea studiului, de preferință tuturor animalelor, dar cel puțin celor din lotul tratat cu doza mare și celor din lotul martor; dacă se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele;

(b) examen hematologic, inclusiv hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de hematii, numărul de leucocite și măsurători ale potențialului de coagulare, cum ar fi timpul de coagulare, timpul de protrombină, timpul de tromboplastină sau numărul de trombocite se măsoară la sfârșitul perioadei de testare;

▼B

(c) determinările biochimice clinice ale sângelui se realizează la sfârșitul perioadei de testare; testele considerate caracteristice pentru toate studiile sunt: balanța electrolitică, metabolismul carbohidraților, funcția hepatică și renală; alegerea unor determinări specifice depinde de observațiile asupra modului de acțiune a substanței de testat. Se pot sugera următoarele determinări: calciu, fosfor, clor, sodiu, potasiu, glucoza à jeun (cu privare de hrană pentru o perioadă caracteristică speciei), transaminaza serică glutamo-piruvică ([1]), transaminaza serică glutamo-oxaloacetică ([2]), ornitin decarboxilază, gama-glutamil transpetidaza, ureea, albumina, creatinina sanguină, bilirubina totală și proteinele totale. Pentru o evaluare toxicologică adecvată pot fi necesare și alte determinări, care includ analizarea lipidelor, hormonilor, echilibrul acidobazic, methemoglobina și activitatea colinesterazică. Se pot efectua, dacă este necesar, și alte determinări biochimice clinice pentru a extinde investigațiile asupra efectelor observate;

(d) nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când există o indicație bazată pe o toxicitate presupusă sau observată.

Dacă datele istorice de bază sunt insuficiente, înainte de începerea tratamentului trebuie să se determine parametrii hematologici și biochimici clinici.

Autopsia

Toate animalele supuse testului fac obiectul autopsiei generale, aceasta incluzând aspectul exterior al corpului, toate orificiile, cavitatea craniană, toracică și cea abdominală și conținutul acestora. Ficatul, rinichii, glandele suprarenale și testiculele trebuie cântărite în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În vederea unor posibile examene histopatologice ulterioare, următoarele organe și țesuturi vor fi păstrate într-un mediu corespunzător: toate leziunile macroscopice, creier, inclusiv secțiuni prin bulb/punte, cortex cerebelos și cortex cerebral, glanda pituitară, tiroida/paratiroidele, țesut timic, traheea și plămânii, inimă, aortă, (glandele salivare), ficat, splină, rinichi, glande suprarenale, pancreas, gonade, uter (glande genitale anexe), (piele), esofag, stomac, duoden, jejun, ileon, cec, colon, rect, vezică urinară, ganglioni limfatici reprezentativi, (glanda mamară la femele), (musculatura coapsei), nervi periferici, stern cu măduvă osoasă, (ochi), (femur – incluzând articulația), (măduva spinării la trei niveluri – cervical, torace mediu și lombar) și (glande lacrimale extraorbitale). Țesuturile menționate între paranteze trebuie examinate doar atunci când acest lucru este indicat prin apariția semnelor de toxicitate sau implicarea organelor țintă.

Examenul histopatologic

(a) Se efectuează examen histopatologic complet pentru toate organele și țesuturile recoltate de la animalele din lotul martor și loturile expuse la doza maximă.

(b) Se examinează toate leziunile macroscopice.

([1]) În prezent cunoscută sub denumirea de alaninaminotransferază.
([2]) În prezent cunoscută sub denumirea de aspartataminotransferază.

▼B

(c) Se examinează organele-țintă ale animalelor din loturile expuse la celelalte doze.

(d) Se examinează histopatologic plămânii animalelor din lotul expus la doza minimă și la cea intermediară pentru a detecta infecțiile, deoarece acestea oferă o evaluare acceptabilă a stării de sănătate a animalelor. Trebuie să fie luată în considerare, de asemenea, examinarea histopatologică a ficatului și rinichiului în cazul acestor loturi. La animalele din aceste loturi nu se fac în mod curent examene histopatologice suplimentare, dar acestea trebuie făcute întotdeauna în cazul acelor organe pentru care s-au constatat leziuni la lotul expus la doza maximă.

(e) Atunci când este folosit un lot satelit, trebuie să se efectueze examene histopatologice pe țesuturile și organele pentru care s-au constatat leziuni la celelalte loturi tratate.

2. **DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului și numărul de animale care prezintă fiecare tip de leziune. Toate rezultatele observate se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate. Se poate folosi orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia, linia, originea, condițiile ambiante, regimul alimentar etc.;

— condițiile de testare;

— dozele (inclusiv vehiculul, dacă este cazul) și concentrațiile;

— răspunsul toxic pe sexe și doză;

— dacă este posibil, nivelul care nu are niciun efect;

— momentul morții în timpul experimentului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— efectele toxice sau de alt tip;

— momentul observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— consumul de hrană și greutatea corporală;

— observațiile oftalmologice;

— examenele hematologice întreprinse și rezultatele complete;

— testele biochimice clinice practicate și rezultatele complete (inclusiv cele urinare);

— rezultatele autopsiei;

▼B

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

▼M4

B.29. TOXICITATEA SUBACUTĂ PRIN INHALARE: STUDIU DE 90 DE ZILE

REZUMAT

Această metodă de testare revizuită B.29 a fost concepută pentru caracterizarea completă a toxicității substanței chimice testate prin calea de inhalare în urma expunerii repetate pe o perioadă limitată (90 de zile), precum și pentru a furniza date pentru evaluările cantitative ale riscului prin inhalare. Grupuri de minim 10 masculi și 10 femele de rozătoare sunt expuse câte 6 ore pe zi timp de 90 de zile (13 săptămâni) la: (a) substanța chimică testată la trei sau mai multe niveluri de concentrație; (b) aer filtrat (grup martor negativ); și/sau (c) vehicul (grup martor pentru vehicul). În general, animalele sunt expuse 5 zile pe săptămână, dar este permisă și expunerea timp de 7 zile pe săptămână. Masculii și femelele se testează întotdeauna, dar pot fi supuși unor niveluri de concentrație diferite dacă se cunoaște că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată. Această metodă permite conducătorului studiului flexibilitatea de a include grupuri satelit (de reversibilitate), lavajul bronhoalveolar (BAL), teste neurologice și evaluări suplimentare clinice chimice testate.

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 413 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 413 originale privind testarea subcronică a fost adoptată în 1981 (1). Această metodă de testare B.29 [ca echivalent al variantei revizuite a Orientării 413 (2009)] a fost actualizată pentru a reflecta nivelul științific și pentru a satisface cerințele de reglementare curente și viitoare.

2. Studiile de toxicitate subcronică prin inhalare se folosesc, în principal, pentru determinarea concentrațiilor de reglementare pentru evaluarea riscului pentru lucrători în cadru ocupațional. De asemenea, ele sunt utilizate pentru evaluarea riscurilor umane în domeniul rezidențial, de transport și de mediu. Această metodă permite caracterizarea efectelor adverse în urma expunerii zilnice repetate, prin inhalarea substanței chimice testate timp de 90 de zile (aproximativ 10 % din durata de viață a unui șobolan). Datele obținute din studii de toxicitate subcronică prin inhalare se pot folosi pentru evaluări cantitative ale riscului și pentru alegerea concentrațiilor pentru studii cronice. Această metodă nu este destinată în mod specific testării nanomaterialelor. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul 39 (2).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

3. Toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată trebuie luate în considerare de laboratorul de testare înainte de efectuarea studiului, pentru îmbunătățirea calității studiului și minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la selectarea celor mai adecvate concentrații de testare corespunzătoare includ: identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimie ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; și date rezultate din testarea toxicității acute prin inhalare. În cazul în care în cursul studiului se anticipează sau se observă neurotoxicitatea, conducătorul studiului poate alege să includă și evaluări adecvate, de exemplu un set de observații funcționale (FOB) și măsurarea activității motorii. Deși momentele expunerii în funcție de examinările specifice pot fi critice, desfășurarea acestor activități suplimentare nu trebuie să afecteze protocolul studiului de bază.

▼M4

4. Diluțiile substanțelor corozive sau iritante testate pot fi testate la concentrații care generează gradul dorit de toxicitate. Vă rugăm să consultați Ghidul 39 (2) pentru informații suplimentare. La expunerea animalelor la aceste materiale, concentrațiile vizate trebuie să fie suficient de mici pentru a nu induce durere sau suferință accentuată, dar totuși suficiente pentru a extinde curba concentrație-răspuns la niveluri care ating obiectivul de reglementare și științific al testului. Aceste concentrații sunt selectate de la caz la caz, preferabil pe baza unui studiu de stabilire a intervalului, conceput corespunzător, care furnizează informații privind efectul critic, pragul de iritare și momentul apariției manifestărilor (a se vedea punctele 11-13). Trebuie să se prezinte justificarea pentru selectarea concentrației.

5. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită trebuie să fie eutanasiate. Animalele muribunde sunt considerate în același mod ca și animalele care mor în cursul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau expuse unor suferințe intense și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul unui ghid OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3).

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

6. Se utilizează rozătoare adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul. Dacă se utilizează alte specii, decizia trebuie să fie motivată.

Pregătirea animalelor

7. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua randomizării, animalele trebuie să fie adulți tineri, în vârstă de 7 până la 9 săptămâni. Greutățile corporale trebuie să fie în intervalul de ± 20 % față de greutatea medie pentru fiecare sex. Animalele sunt selectate la întâmplare, marcate pentru a permite identificarea individuală și ținute în cuștile lor cel puțin 5 zile înainte de începerea testului, pentru a permite aclimatizarea lor la condițiile de laborator.

Îngrijirea animalelor

8. Animalele sunt identificate individual, preferabil cu transpondere subcutanate, pentru a facilita observarea și a evita confuziile. Temperatura camerei în care sunt ținute animalele folosite în scopuri experimentale trebuie să fie de 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă este menținută, în mod ideal, în intervalul 30-70 %, deși, acest lucru ar putea să nu fie posibil în cazul utilizării apei ca vehicul. În general, înainte și după expuneri animalele sunt închise în cuști, în grupuri, în funcție de sex și concentrație, dar numărul de animale dintr-o cușcă nu trebuie să perturbe observarea clară a fiecărui animal și trebuie să minimizeze pierderile cauzate de canibalism și lupte. În cazul în care animalele sunt expuse doar în zona nasului, poate fi necesară aclimatizarea lor la tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu trebuie să producă asupra animalului un stres excesiv fizic, termic sau prin imobilizare. Fixarea poate afecta puncte finale fiziologice, cum ar fi temperatura corporală (hipertermie) și/sau debitul respirator pe minut. În cazul în care sunt disponibile date generice pentru a arăta că nu se produc asemenea modificări în vreo măsură considerabilă, nu este necesară adaptarea prealabilă la tuburile de imobilizare. Animalele expuse unor aerosoli cu întregul corp sunt plasate individual în timpul expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolului testat prin blana celorlalte animale din cușcă. Se pot folosi regimuri alimentare clasice și certificate utilizate în laboratoare, cu excepția perioadei de expunere iar apa potabilă de la rețeaua municipală se poate furniza în mod nelimitat. Iluminatul trebuie să fie artificial, cu o succesiune de 12 ore de lumină/12 ore de întuneric.

▼M4

Incintele de inhalare

9. La selectarea unei incinte de inhalare se iau în considerare natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul de expunere preferat este doar în zona nasului (expresie care include expunerea doar în zona capului, a nasului sau a botului). În general, expunerea doar în zona nasului este preferată pentru studii ale aerosolilor lichizi sau solizi și pentru vapori care pot condensa pentru a forma aerosoli. Obiectivele speciale ale studiului pot fi atinse mai bine prin utilizarea unui mod de expunere prin intermediul întregului corp, dar acest lucru trebuie să fie justificat în raportul de studiu. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei la utilizarea unei incinte pentru întregul corp, volumul total al animalelor testate nu trebuie să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere doar în zona nasului și a întregului corp, precum și avantajele sau dezavantajele lor particulare sunt descrise în Ghidul 39 (2).

STUDII DE TOXICITATE

Concentrațiile-limită

10. Spre deosebire de studiile de toxicitate acută, în studiile de toxicitate subcronică prin inhalare nu sunt definite limite de concentrație. Concentrația testată maximă trebuie să țină seama de: 1. concentrația maximă realizabilă; 2. nivelul de expunere umană în „cele mai nefavorabile condiții”; 3. necesitatea de a menține un aport adecvat de oxigen; și/sau 4. considerații care țin de bunăstarea animalelor. În absența unor limite bazate pe date, se pot utiliza limitele acute din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (13) (până la o concentrație maximă de 5 mg/l pentru aerosoli, 20 mg/l pentru vapori și 20 000 ppm pentru gaze); a se vedea Ghidul 39 (2). În cazul în care este necesar să se depășească aceste limite la testarea gazelor sau substanțelor chimice testate foarte volatile (de exemplu, agenți frigorifici), trebuie să se prezinte justificarea. Concentrația-limită trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce un stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

Studiul de stabilire a intervalului

11. Înainte de a începe studiul principal, poate fi necesar un studiu de stabilire a intervalului. Un studiu de stabilire a intervalului este mai cuprinzător decât un studiu de observare, deoarece nu se limitează la alegerea concentrației. Cunoștințele dobândite în urma unui studiu de stabilire a intervalului pot conduce la un studiu principal reușit. Un studiu de stabilire a intervalului poate, de exemplu, să furnizeze informații tehnice privind metodele analitice, granulometrie, descoperirea mecanismelor toxice, date de patologie clinică și histopatologice și estimări asupra posibilelor concentrații NOAEL și MTC în studiul principal. Conducătorul studiului poate alege să folosească studiul de stabilire a intervalului pentru identificarea pragului de iritare a căilor respiratorii (de exemplu, prin examenul histopatologic al căilor respiratorii, testarea funcției pulmonare sau lavaj bronhoalveolar), a concentrației superioare care este tolerată de animale fără a provoca un stres excesiv și a parametrilor care vor caracteriza cel mai bine toxicitatea unei substanțe chimice testate.

12. Într-un studiu de stabilire a intervalului se pot stabili unul sau mai multe niveluri de concentrație. În funcție de efectele alese, se expun trei până la șase masculi și trei până la șase femele la fiecare nivel de concentrație. Un studiu de stabilire a intervalului durează cel puțin 5 zile și, în general, nu mai mult de 28 de zile. Raportul de studiu trebuie să conțină justificarea alegerii concentrațiilor pentru studiul principal Obiectivul studiului principal este să demonstreze relația concentrație-răspuns pe baza efectului anticipat ca fiind cel mai sensibil Concentrația inferioară este, în mod ideal, o concentrație fără efect advers observabil iar concentrația superioară trebuie să determine toxicitatea neechivocă, fără a induce stres excesiv pentru animale și fără a le afecta longevitatea (3).

▼M4

13. La selectarea nivelurilor de concentrație pentru studiul de stabilire a intervalului, se folosesc toate informațiile disponibile, inclusiv relațiile structură-activitate și date pentru substanțe similare (a se vedea punctul 3). Un studiu de stabilire a intervalului poate confirma/infirma efectele considerate a fi cele mai sensibile din punct de vedere al mecanismului, de exemplu inhibarea colinesterazei de către fosfați organici, formarea methemoglobinei de către agenți toxici pentru eritrocite, hormonii tiroidieni (T_3, T4) pentru agenții toxici față de tiroidă, proteinele, valoarea LDH sau neutrofilele în lavajul bronhoalveolar pentru particule puțin solubile nedăunătoare sau aerosoli iritanți pentru plămâni.

Studiul principal

14. În studiul principal de toxicitate subacută se folosesc, în general, trei niveluri de concentrație și grupuri martor negative (cu aer) și/sau cu vehicul studiate în paralel, după cum este necesar (a se vedea punctul 18). Toate datele disponibile sunt utilizate pentru a contribui la selectarea nivelurilor de expunere adecvate, inclusiv rezultatele studiilor de toxicitate sistemică, metabolism și cinetică (trebuie acordată o atenție specială evitării nivelurilor ridicate de concentrație care saturează procesele cinetice). Fiecare grup testat conține cel puțin 10 rozătoare masculi și 10 rozătoare femele expuse la substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 5 zile pe săptămână, pe o perioadă de 13 săptămâni (durata totală a studiului trebuie să fie de cel puțin 90 de zile). Animalele pot fi expuse și 7 zile pe săptămână (de exemplu, la testarea produselor farmaceutice inhalate). În cazul în care se știe că un sex este mai receptiv la o anumită substanță chimică testată, sexele pot fi expuse la niveluri diferite de concentrație pentru optimizarea răspunsului la concentrație, așa cum se arată la punctul 15. Atunci când alte specii de rozătoare sunt expuse doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. La utilizarea unei durate de expunere sub 6 ore/zi sau în cazul în care este necesar să se efectueze un studiu cu expunerea întregului corp pe o durată lungă (de exemplu, 22 de ore/zi), trebuie să se prezinte o justificare [a se vedea Ghidul 39 (2)]. Alimentarea se sistează în perioada expunerii, în afară de cazul în care expunerea depășește 6 ore. La expunerea la nivelul întregului corp se poate asigura apa.

15. Concentrațiile-țintă selectate trebuie să identifice organele-țintă și să demonstreze o relație clară concentrație-răspuns:

— nivelul de concentrație ridicat trebuie să inducă efecte toxice, dar să nu determine simptome persistente sau mortalitate, fapt ce ar preveni o evaluare semnificativă;

— nivelurile de concentrație intermediare trebuie să fie administrate eșalonat, astfel încât efectele toxice să fie graduale între concentrația redusă și cea ridicată;

— nivelul de concentrație redusă trebuie să producă o toxicitate redusă sau să nu producă semne de toxicitate.

Sacrificările pe parcursul studiului

16. Dacă se prevede sacrificarea unui număr de animale pe parcursul studiului, acest număr se adaugă la total. Trebuie să se prezinte justificarea pentru recurgerea la sacrificări pe parcursul studiului, iar analizele statistice le vor lua în considerare în mod corespunzător.

▼M4

Studiul satelit (de reversibilitate)

17. Un studiu satelit (de reversibilitate) se poate folosi pentru a observa reversibilitatea, persistența sau apariția cu întârziere a toxicității pentru o perioadă post-tratament de lungime adecvată, dar nu mai mare de 14 zile. Grupurile satelit (de reversibilitate) constau în 10 masculi și 10 femele expuse în paralel cu animalele folosite în scopuri experimentale din studiul principal. Grupurile din studiile satelit (de reversibilitate) sunt expuse la substanța chimică testată la nivelul maxim de concentrație și trebuie să existe grupuri martor cu aer și/sau vehicul studiate în paralel, după caz (a se vedea punctul 18).

Animalele din grupul martor

18. Animalele din grupul martor negativ (cu aer) studiat în paralel se manipulează într-o manieră identică cu cele din grupul de testare, cu excepția faptului că sunt expuse la aer filtrat în locul substanței chimice testate. În cazul în care se folosește apa sau altă substanță pentru generarea atmosferei de testare, trebuie să se includă în studiu un grup martor pentru vehicul, în locul grupului martor negativ (cu aer). Când este posibil, se folosește apa ca vehicul. Când se folosește apa ca vehicul, animalele din grupul martor sunt expuse la aer cu aceeași umiditate relativă ca și grupurile expuse. Alegerea unui vehicul adecvat se bazează pe un studiu preliminar corespunzător sau pe date anterioare. În cazul în care nu se cunoaște bine toxicitatea unui vehicul, conducătorul studiului poate alege să folosească atât un grup martor negativ (aer) cât și un martor pentru vehicul, dar această abordare este categoric descurajată. În cazul în care datele anterioare arată că vehiculul nu este toxic, nu este necesar un grup martor negativ (aer) și se folosește doar un grup martor pentru vehicul. În cazul în care un studiu preliminar al unei substanțe chimice testate formulate într-un vehicul nu prezintă nicio toxicitate, rezultă că vehiculul nu este toxic la concentrația testată și se va utiliza acest control pentru vehicul.

CONDIȚII DE EXPUNERE

Administrarea concentrațiilor

19. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația aleasă și/sau forma fizică cu cea mai mare probabilitate de prezență în timpul manipulării și utilizării substanței chimice testate. Substanțele chimice testate higroscopice și reactive din punct de vedere chimic trebuie să fie testate în condiții de aer uscat. Trebuie avut grijă să se evite generarea unor concentrații explozive. Materialele sub formă de particule pot fi supuse unor procese mecanice pentru reducerea dimensiunii particulelor. Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul 39 (2).

Distribuția granulometrică

20. Granulometria trebuie să fie efectuată pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa pentru a forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor regiunilor relevante ale căilor respiratorii, se recomandă aerosoli cu diametru aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) de la 1 la 3 μm, cu o abatere standard geometrică (σ_g) în intervalul 1,5-3,0 (4). Trebuie depus un efort rezonabil pentru a satisface acest standard, dar în cazul în care acest lucru nu se poate realiza trebuie să se prezinte o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele de vapori metalici vor fi mai mici decât acest standard, iar particulele cu sarcină electrică și fibrele pot fi mai mari.

▼M4

Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul

21. În mod ideal, substanța chimică se testează fără vehicul. În cazul în care este necesar să se folosească un vehicul pentru a genera o concentrație și o dimensiune a particulelor corespunzătoare pentru substanța chimică testată, se preferă apa. Întotdeauna când o substanță chimică testată este dizolvată într-un vehicul, trebuie să se demonstreze stabilitatea sa.

MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE

Debitul de aer în incintă

22. Debitul de aer prin incinta de expunere este controlat cu atenție, monitorizat continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea în timp real a concentrației (sau stabilității în timp a) atmosferei de testare este un indicator integral al tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de control al parametrilor dinamici relevanți pentru inhalare. În cazul în care concentrația este monitorizată în timp real, frecvența măsurătorii debitelor de aer se poate reduce la o singură măsurătoare pentru fiecare expunere și fiecare zi. Trebuie acordată o atenție specială pentru evitarea reinhalării în incinte pentru expunere doar în zona nasului. Concentrația de oxigen trebuie să fie de minimum 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu trebuie să depășească 1 %. În cazul în care există motive să se considere că nu se poate atinge acest standard, trebuie măsurate concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon. În cazul în care măsurătorile în prima zi de expunere arată că aceste gaze sunt la niveluri corespunzătoare, nu mai sunt necesare alte măsurători.

Temperatura și umiditatea relativă în incintă

23. Temperatura incintei trebuie să se mențină la 22 ± 3 °C. Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor, pentru expunerea în zona nasului și a întregului corp, trebuie să fie monitorizată și înregistrată orar în timpul fiecărei expuneri, dacă este posibil. Este preferabil ca umiditatea relativă să fie menținută în intervalul 30-70 % dar acest lucru poate fi irealizabil (de exemplu, la testarea amestecurilor apoase) sau imposibil de măsurat din cauza interferenței substanței chimice testate cu metoda de testare.

Substanța chimică testată: concentrația nominală

24. Când este posibil, trebuie să se calculeze și să se înregistreze concentrația nominală în incinta de expunere. Concentrația nominală este masa substanței chimice testate generate împărțită la volumul total de aer vehiculat prin sistemul incintei. Concentrația nominală nu este folosită pentru a caracteriza expunerea animalelor, dar o comparație între concentrația nominală și concentrația efectivă oferă o indicație privind eficiența de generare a sistemului de testare și astfel se poate folosi pentru a descoperi probleme legate de generare.

Substanța chimică testată: concentrația efectivă

25. Concentrația efectivă este concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalelor într-o incintă de inhalare. Concentrațiile efective se pot obține prin metode specifice (de exemplu, prin prelevare directă, metode bazate pe adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau prin metode nespecifice, cum ar fi analiza gravimetrică a filtrului. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptabilă doar pentru aerosoli cu component pulverulent unic sau aerosoli cu lichide cu volatilitate redusă și trebuie susținută printr-un studiu preliminar privind caracterizările specifice ale substanței chimice testate. Concentrația aerosolilor cu pulberi multicomponent se poate determina tot prin analiză gravimetrică. Dar, în

▼M4

acest caz sunt necesare date analitice care să demonstreze similaritatea între compoziția materialului antrenat de aer și cea a materialului inițial. În cazul în care nu sunt disponibile aceste informații, poate fi necesară reanalizarea la intervale regulate a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer). Pentru agenții sub formă de aerosoli care se pot evapora sau care pot sublima, trebuie să se demonstreze că toate fazele au fost colectate prin metoda aleasă.

26. Trebuie să se folosească un lot de substanță chimică testată pe întreaga durată a studiului, dacă este posibil, iar proba testată să fie păstrată în condiții care îi asigură puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, trebuie să existe o caracterizare a substanței chimice testate, inclusiv puritatea sa și, dacă este realizabil din punct de vedere tehnic, identitatea și cantitățile de contaminanți și impurități identificate. Aceasta se poate demonstra prin următoarele date, dar fără limitare la acestea: timpul de retenție și zona de vârf relativ, masa moleculară determinată prin analize de spectroscopie de masă sau cromatografie în stare gazoasă sau alte estimări. Deși identitatea probei de testare nu constituie responsabilitatea laboratorului care efectuează testarea, o atitudine prudentă pentru acel laborator ar fi să confirme caracterizarea solicitantului, cel puțin în mod limitat (de exemplu, culoare, natura fizică etc.).

27. Atmosfera de expunere este menținută cât mai constantă posibil. Pentru a demonstra stabilitatea condițiilor de expunere se poate utiliza un dispozitiv de monitorizare în timp real, de exemplu un fotometru pentru aerosoli sau un analizor de carbon total pentru vapori. Concentrația efectivă în incintă se măsoară de minimum 3 ori în timpul fiecărei zile de expunere pentru fiecare nivel de expunere. În cazul în care acest lucru nu este realizabil din cauza debitelor limitate de aer sau a concentrațiilor reduse, se poate preleva o probă pe parcursul întregii perioade de expunere. În mod ideal, această probă se prelevează apoi pe întreaga perioadă de expunere. Probele individuale de concentrație din incintă nu trebuie să se abată de la concentrația medie cu mai mult de ± 10 % pentru gaze și vapori sau ± 20 % pentru aerosolii cu lichide sau solide. Se calculează și se înregistrează timpul necesar pentru echilibrarea incintei (t_{95}). Durata unei expuneri acoperă timpul în care este generată substanța chimică testată. Aceasta ia în considerare timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incintă (t_{95}) și pentru descompunere. Îndrumări pentru estimarea t_{95} pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

28. Pentru amestecurile foarte complexe constând în gaze/vapori și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate propulsate de produse/dispozitive de utilizare finală cu acționare specifică), fiecare fază se poate comporta diferit într-o incintă de inhalare. Prin urmare, se selectează cel puțin o substanță indicatoare (analit), de obicei substanța activă principală din amestec, din fiecare fază (gaz/vapori și aerosol). În cazul în care substanța chimică testată este un amestec, trebuie să se raporteze concentrația analitică pentru amestecul total și nu doar pentru ingredientul activ sau substanța indicatoare (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

Substanța chimică testată: distribuția granulometrică

29. Granulometria aerosolilor trebuie să fie efectuată cel puțin săptămânal pentru fiecare nivel de concentrație, folosind un impactor în cascadă sau un instrument alternativ, de exemplu un aparat aerodinamic de granulometrie (APS). În cazul în care se obține o echivalență a rezultatelor obținute cu impactorul în cascadă și un instrument alternativ, se poate folosi instrumentul alternativ pentru întregul studiu.

▼M4

30. Un al doilea dispozitiv, de exemplu un filtru gravimetric sau un epurator/barbotor de gaze trebuie să se folosească în paralel cu primul instrument, pentru a confirma eficiența colectării la primul instrument. Concentrația masică obținută prin analiza granulometriei trebuie să fie în concordanță rezonabilă cu concentrația masică obținută prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (2)]. În cazul în care se poate demonstra echivalența tuturor concentrațiilor în faza inițială a studiului, se pot omite alte măsurători de confirmare. Pentru motive legate de bunăstarea animalelor, se iau măsuri pentru a minimiza datele neconcludente care pot duce la necesitatea de repetare a unui studiu.

31. Granulometria se efectuează pentru vapori atunci există vreo posibilitate ca prin condensarea vaporilor să se ajungă la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule între atmosferă cu vapori cu potențial de formare a unor faze mixte.

OBSERVAȚII

32. Observarea clinică a animalelor trebuie să se facă înainte, în timpul și ulterior perioadei de expunere. Poate fi indicată observarea mai frecventă în funcție de răspunsul animalelor în timpul expunerii. În cazul în care observarea animalelor este împiedicată de utilizarea tuburilor de imobilizare, incintelor slab iluminate pentru expunerea întregului corp sau atmosferelor opace, animalele se observă cu atenție după expunere. Prin observarea înainte de expunerea din ziua următoare se poate evalua reversibilitatea sau exacerbarea efectelor toxice.

33. Toate observațiile se consemnează în evidențele individuale pentru fiecare animal. În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

34. Observațiile privind animalele în cușcă trebuie să includă modificările pielii și blănii, ochilor și mucoaselor; modificarea sistemului respirator și sistemului circulator; modificările sistemului nervos; modificări în activitatea somato-motorie și modelele de comportament. Se va acorda o atenție specială observării tremorului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate furniza dovezi privind bradipneea reflexă sau hipo/hipertermia asociate cu tratamentul sau cu privarea de libertate. În protocolul studiului pot fi incluse evaluări suplimentare, de exemplu privind cinetica, biomonitorizarea, funcționarea plămânilor, retenția unor materiale slab solubile care se acumulează în țesutul pulmonar și modificările de comportament.

GREUTATEA CORPORALĂ

35. Greutatea animalelor individuale se consemnează cu puțin înaintea primei expuneri (ziua 0), apoi de două ori pe săptămână (de exemplu: vineri și luni, pentru a evidenția recuperarea după un weekend fără expunere sau la un interval de timp pentru a permite evaluarea toxicității sistemice) și la momentul morții sau eutanasierii. În cazul în care nu există efecte în primele 4 săptămâni, greutățile corporale pot fi măsurate săptămânal pe restul duratei studiului. În cazul în care se folosesc animale din grupuri satelit (cu reversibilitate), acestea se cântăresc în continuare săptămânal pe întreaga perioadă de recuperare. La încheierea studiului, toate animalele sunt cântărite cu puțin înainte de sacrificare, pentru a permite calcularea corectă a rapoartelor între greutatea organelor și cea corporală.

CONSUMUL DE HRANĂ ȘI APĂ

36. Consumul de hrană trebuie să fie măsurat săptămânal. De asemenea, se poate măsura și consumul de apă.

▼M4

PATOLOGIA CLINICĂ

37. Evaluările de patologie clinică trebuie să fie efectuate pentru toate animalele, inclusiv pentru animalele din grupul martor și grupul satelit (de reversibilitate), atunci când sunt sacrificate. Se consemnează intervalul de timp între încetarea expunerii și recoltarea de sânge, în special dacă restabilirea efectului vizat este rapidă. Se recomandă prelevarea după expunere pentru acei parametri cu timp scurt de înjumătățire plasmatică (de exemplu, COHb, CHE și MetHb).

38. Tabelul 1 prezintă parametrii de patologie clinică necesari, în general, pentru toate studiile toxicologice. Nu este necesară efectuarea cu regularitate a analizei de urină, ci numai atunci când se consideră util, pe baza toxicității presupuse sau observate. Conducătorul studiului poate opta pentru evaluarea unor parametri suplimentari pentru o mai bună caracterizare a toxicității substanței chimice testate (de exemplu, colinesterază, lipide, hormoni, echilibrul acido-bazic, methemoglobina sau corpii Heinz, creatinkinaza, raportul mieloid/eritroid, troponinele, gazele din sângele arterial, dehidrogenaza lactică, sorbitol dehidrogenaza, glutamat dehidrogenaza și gama glutamil transpeptidaza).

Tabelul 1

Parametri standard de patologie clinică

Examen hematologic	
Număr de eritrocite	Număr total de leucocite
Hematocrit	Formulă leucocitară
Concentrația de hemoglobină	Număr de plachete
Hemoglobina corpusculară medie	Potențial de coagulare (selectați unul):
Volumul corpuscular mediu	— timp de protrombină
Concentrația hemoglobinei corpusculare medii	— timp de coagulare;
Reticulocite	— timp de tromboplastină parțial
Chimie clinică	
Glucoză (*)	Alanin aminotransferază
Colesterol total	Aspartat aminotransferază
Trigliceride	Fosfatază alcalină
Azot ureic în sânge	Potasiu
Bilirubină totală	Sodiu
Creatinină	Calciu
Proteine totale	Fosfor
Albumină	Clor
Globulină	
Analiza urinei (opțional)	
Aspect (culoare și turbiditate)	Proteine totale
Volum	Glucoză
Greutate specifică sau osmolalitate	Hematurie
pH	

(*) Deoarece o perioadă îndelungată de privare de hrană poate introduce dezechilibre în măsurătorile de glucoză la animalele tratate comparativ cu animalele din grupul martor, conducătorul studiului determină dacă este cazul ca animalele să fie private de hrană. În cazul în care se aplică o perioadă de privare de hrană, aceasta va fi corespunzătoare speciei folosite; pentru șobolani, aceasta poate fi de 16 ore (privare de hrană pe timpul nopții). Determinarea glucozei à jeun se poate face după privarea de hrană pe timpul nopții în ultima săptămână de expunere sau după privarea de hrană pe timpul nopții înainte de autopsie (în cazul din urmă, împreună cu toți ceilalți parametri de patologie clinică).

▼M4

39. În cazul în care există dovezi că principalul loc de depunere și retenție este în căile respiratorii inferioare (adică alveolele), lavajul bronhoalveolar (BAL) poate fi tehnica de elecție pentru analiza cantitativă a parametrilor doză-efect ipotetici, cu accentul pe alveolită, inflamație pulmonară și fosfolipidoză. Aceasta permite studierea adecvată a modificărilor doză-răspuns și a evoluțiilor în timp ale leziunilor alveolare. Lichidul BAL poate fi analizat pentru determinarea nivelului total de leucocite și a formulei leucocitare, a proteinelor totale și a lactat dehidrogenazei. Alți parametri care pot fi luați în considerare sunt cei indicatori ai leziunilor lizozomale, fosfolipidozei, fibrozei și inflamației iritante sau alergice, putând include determinarea citokinelor/chemokinelor pro-inflamatoare. În general, măsurătorile BAL completează rezultatele examinărilor histopatologice, dar nu le pot înlocui. Îndrumări pentru modul de efectuare a lavajului pulmonar pot fi găsite în Ghidul 39 (2).

EXAMENUL OFTALMOLOGIC

40. Cu ajutorul unui oftalmoscop sau unui dispozitiv echivalent, la toate animalele trebuie să se efectueze examinări oftalmologice ale fundului de ochi, mediului de refracție, irisului și conjunctivei, înainte de administrarea substanței chimice testate și pentru toate grupurile cu concentrație ridicată și grupurile martor la final. În cazul în care se constată modificări oculare, se vor examina toate animalele din celelalte grupuri, inclusiv din grupul satelit (de reversibilitate).

PATOLOGIA MACROSCOPICĂ ȘI GREUTATEA ORGANELOR

41. Toate animalele testate, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eliminate din studiu din rațiuni care țin de bunăstare animală, sunt supuse unei evacuări complete a sângelui (dacă este posibil) și unei autopsii. Se consemnează timpul între încheierea ultimei expuneri a fiecărui animal și sacrificarea sa. În cazul în care autopsia nu se poate efectua imediat ce a fost descoperit un animal mort, animalul este refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile se efectuează imediat ce este posibil, în mod normal după una sau două zile. Toate modificările patologice macroscopice trebuie să fie consemnate pentru fiecare animal, cu o atenție specială pentru orice modificări ale căilor respiratorii.

42. Tabelul 2 prezintă organele și țesuturile care se păstrează într-un mediu corespunzător în timpul autopsiei în vederea unor examene histopatologice. Conservarea organelor și țesuturilor încadrare în paranteze pătrate [ ] și a altor organe și țesuturi este la aprecierea conducătorului studiului. Organele trecute cu caractere **aldine** se curăță și cântăresc în stare umedă, cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Tiroida și epididimul se cântăresc doar dacă este necesar, deoarece artefactele în urma curățării pot împiedica evaluarea histopatologică. Țesuturile și organele sunt fixate în formol tamponat 10 % sau alt fixator adecvat, imediat după autopsie și nu mai puțin de 24-48 de ore înainte de curățare, în funcție de fixatorul folosit.

▼M4

Tabelul 2

Organe și țesuturi conservate în cursul autopsiei macroscopice

Glande suprarenale	Esofag
Aortă	[Bulb olfactiv]
Măduva osoasă (și/sau aspirat proaspăt)	**Ovare**
Creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și punte)	Pancreas
Cec	Glande paratiroide
Colon	Nerv periferic (sciatic sau tibial, preferabil aproape de mușchi)
Duoden	Hipofiză
[**Epididim**]	Prostată
[Ochi (retină, nerv optic) și pleoape]	Rect
Femur și articulația genunchiului	Glande salivare
Vezica biliară (în cazul în care este prezentă)	Vezicule seminale
[glande Harder]	Piele
Inimă	Măduva spinării (cervicală, toracică mediană și lombară)
Ileon	**Splină**
Jejun	Stern
Rinichi	Stomac
[glande lacrimale (extraorbitale)]	Dinți
Laringe (3 niveluri, inclusiv baza epiglotei)	**Testicule**
Ficat	**Timus**
Plămân (toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale)	**Tiroida**
Noduli limfatici din zona hilusului pulmonar, în special în cazul substanțelor chimice testate cu particule slab solubile. Pentru examinări și studii mai aprofundate de natură imunologică, pot fi luați în considerare noduli limfatici suplimentari, de exemplu cei din regiunile mediastinale, cervicale/submandibulare și/sau auriculare.	[Limbă]
	Trahee (cel puțin 2 niveluri, inclusiv o secțiune longitudinală prin carină și o secțiune transversală)
Noduli limfatici (distal față de punctul de intrare)	[Ureter]
Glande mamare (la femele)	[Uretră]
Mușchi (coapsă)	Vezica urinară
Țesuturi nazo-faringiene [minim 4 niveluri; un nivel include ductul nazo-faringian și țesutul limfoid asociat mucoasei nazale (NALT)]	**Uter**
	Organe-țintă
	Toate leziunile și formațiunile mari

▼M4

43. Plămânii se prelevează intacți, se cântăresc și se tratează cu un fixator adecvat la o presiune de 20-30 cm coloană de apă, pentru a asigura conservarea structurii pulmonare (5). Secțiunile sunt colectate pentru toți lobii la un nivel, inclusiv bronhiile principale, dar în cazul în care se efectuează lavajul pulmonar, lobul nelavat trebuie să fie secționat în trei niveluri (nu secțiuni seriale).

44. Se examinează minimum 4 niveluri de țesuturi nazo-faringiene, dintre care unul include ductul nazo-faringian (5) (6) (7) (8) (9), pentru a permite examinarea adecvată a epiteliului scuamos, tranzițional (respirator neciliat), respirator (respirator ciliat) și olfactiv și a țesutului limfatic de drenare (NALT) (10) (11). Se examinează trei niveluri ale laringelui, iar unul dintre aceste niveluri trebuie să includă baza epiglotei (12). Se examinează minimum trei niveluri ale traheii, inclusiv o secțiune longitudinală prin carina de la bifurcația bronhiilor extrapulmonare și o secțiune transversală.

EXAMENUL HISTOPATOLOGIC

45. Se efectuează o evaluare histopatologică a tuturor organelor și țesuturilor enumerate în Tabelul 2 pentru grupurile martor și de concentrație ridicată și pentru toate animalele care mor sau sunt sacrificare în cursul studiului. Se acordă o atenție specială organelor căilor respiratorii, organelor-țintă și leziunilor macroscopice. Organele și țesuturile care prezintă leziuni în grupul de concentrație ridicată se examinează la toate grupurile Conducătorul studiului poate alege să efectueze evaluările histopatologice pentru grupuri suplimentare, pentru a demonstra o relație clară concentrație-răspuns. Atunci când se folosește un grup satelit (de reversibilitate), se efectuează un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate. În cazul în care intervin excesiv de multe decese premature sau alte probleme în grupul cu expunere ridicată, compromițând semnificația datelor, se examinează histopatologic următorul nivel inferior de concentrație. Se încearcă o corelare a observațiilor macroscopice cu rezultatele microscopice.

DATE ȘI RAPORT

Date

46. Trebuie să se furnizeze date individuale despre animale referitoare la greutatea corporală, consumul de hrană, patologia clinică, patologia macroscopică, greutatea organelor și examenul histopatologic. Datele privind observațiile clinice sunt rezumate în formă tabelară, prezentând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate din motive umane, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere, evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și constatările autopsiei. Toate rezultatele cantitative și incidentale se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Se poate folosi orice metodă statistică acceptată, iar metodele statistice și datele care urmează să fie analizate se aleg în etapa în care este conceput studiul.

Raportul de testare

47. Raportul de testare include următoarele informații, după caz:

Animalele testate și îngrijirea lor:

— descrierea condițiilor de ținere în cuști, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) de animale pe fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de iluminat și identificarea regimului alimentar;

▼M4

— specia/sușa utilizată și justificarea pentru utilizarea altor animale decât șobolanul. Se prezintă sursa și datele anterioare, în cazul în care provin de la animale expuse la condiții similare de expunere, adăpost și privare de hrană;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— metoda de randomizare;

— descrierea oricăror condiții dinainte de testare, inclusiv regimul alimentar, carantina și tratamentul unor boli.

Substanța chimică testată:

— natura fizică, puritatea și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizarea);

— date de identificare și numărul din registrul CAS, dacă este cunoscut.

Vehiculul:

— justificarea utilizării vehiculului și alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa);

— date istorice sau concomitente, care demonstrează că vehiculul nu interferează cu rezultatul studiului.

Incinta de inhalare:

— descrierea incintei de inhalare, inclusiv volumul și o diagramă;

— sursa și descrierea echipamentului folosit pentru expunerea animalelor precum și pentru generarea atmosferei;

— echipamentul pentru măsurarea temperaturii, umidității, dimensiunii particulelor și concentrației efective;

— sursa de aer și sistemul folosit pentru condiționare;

— metodele folosite pentru calibrarea echipamentului, pentru a asigura o atmosferă de testare omogenă;

— diferența de presiune (pozitivă și negativă);

— orificiile de expunere pentru fiecare incintă (pentru expunere doar în zona nasului); amplasarea animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);

— stabilitatea atmosferei de testare;

— amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;

— tratarea aerului introdus/extras;

— debitele de aer, debitul de aer/orificiu de expunere (doar în zona nasului) sau numărul de animale/incintă (expunerea întregului corp);

— timpul necesar pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare (t_{95});

— numărul de schimburi de volum pe oră;

— dispozitive de măsurare (după caz).

Datele privind expunerea:

— justificarea alegerii concentrației-țintă în studiul principal;

▼M4

— concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul de aer vehiculat prin incintă);

— concentrațiile efective ale substanței chimice testate, din probe prelevate din zona de respirație a animalelor; pentru amestecuri care generează forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), fiecare poate fi analizată separat;

— toate concentrațiile în aer se consemnează în unități de masă (mg/l, mg/m^3 etc.), nu în unități de volum (ppm, ppb etc.);

— distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea standard geometrică (σg), inclusiv metodele pentru calcularea lor. Se consemnează analizele granulometrice individuale.

Condițiile de testare:

— detaliile preparării substanței chimice testate, inclusiv detalii privind orice proceduri folosite pentru a reduce dimensiunea particulelor materialelor solide sau pentru a prepara soluții ale substanței chimice testate;

— o descriere (preferabil incluzând o diagramă) a echipamentului folosit pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la atmosfera de testare;

— detalii privind echipamentul utilizat pentru monitorizarea temperaturii incintei, umidității și debitului de aer prin incintă (adică realizarea unei curbe de calibrare);

— detalii privind echipamentul utilizat pentru prelevarea probelor în vederea determinării concentrației în incintă și a dimensiunii particulelor;

— detalii privind metoda de analiză chimică folosită și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);

— metoda de randomizare în evaluarea animalelor din grupurile de testare și martor;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursa de apă);

— justificarea pentru selectarea concentrațiilor de testare.

Rezultate:

— prezentarea în formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer în incintă;

— prezentarea în formă tabelară a datelor de concentrație nominală și efectivă în incintă;

— prezentarea în formă tabelară a datelor privind dimensiunea particulelor, inclusiv a datelor privind colectarea probelor analitice, distribuția granulometrică și calcularea DAMM și σ_g;

— prezentarea în formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul de concentrație la fiecare animal (adică animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

▼M4

— prezentarea în formă tabelară a greutăților animalelor individuale;

— prezentarea în formă tabelară a consumului de hrană;

— prezentarea în formă tabelară a datelor de patologie clinică;

— concluziile autopsiei și concluziile examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile.

Discutarea și interpretarea rezultatelor:

— trebuie acordată o atenție specială descrierii metodelor folosite pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația-limită sau granulometria;

— trebuie să se abordeze inhalabilitatea particulelor din perspectiva rezultatelor generale, în special în cazul în care nu se pot realiza criteriile privind dimensiunea particulelor;

— în evaluarea de ansamblu a studiului trebuie să fie incluse coerența metodelor folosite pentru a determina concentrațiile nominale și efective și relația între concentrația efectivă și concentrația nominală;

— trebuie să se analizeze cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);

— trebuie să se prezinte o explicație în cazul în care a fost necesară eutanasierea animalelor cu dureri sau care prezintă semne de suferință gravă și prelungită, pe baza criteriilor din Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (3);

— trebuie să se identifice organul sau organele-țintă;

— trebuie să se determine NOAEL și LOAEL.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (1981), *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E. și Redden J.C. (1994), Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985), Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) în *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds.), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young J.T. (1981), Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema J.R. (1990), Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994), Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. În: Waalkes M.P. and Ward J.M. (eds.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994), Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992), The role of nasopharyngeal lymphoid tissue, Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003), Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis D.J. (1981), Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia, Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanță chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

B.30. STUDII DE TOXICITATE CRONICĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 452 (2009) a OCDE. Versiunea originală a Orientării 452 a fost adoptată în 1981. S-a considerat necesară elaborarea acestei metode de testare revizuite B.30 pentru a reflecta evoluțiile recente în domeniul bunăstării animalelor și cerințelor de reglementare (1) (2) (3) (4). Actualizarea acestei metode de testare B.30 s-a realizat în paralel cu revizuirea capitolului B.32 din prezenta anexă („Studii privind carcinogenitatea”) și a capitolului B.33 din prezenta anexă („Studii combinate de toxicitate cronică și carcinogenitate”), cu obiectivul de a obține informații suplimentare de la animalele folosite în studiu și de a furniza detalii suplimentare privind alegerea dozelor. Această metodă testare este concepută pentru a fi utilizată la testarea unei game largi de substanțe, inclusiv pesticide și produse chimice industriale.

2. Majoritatea studiilor de toxicitate cronică sunt efectuate pe specii de rozătoare, prin urmare, această metodă de testare este destinată aplicării în primul rând la studiile efectuate pe aceste specii. În cazul în care sunt necesare studii pe alte specii în afara rozătoarelor, se pot aplica, de asemenea, principiile și procedurile prezentate în această metodă de testare, împreună cu cele prezentate în capitolul B.27 din prezenta anexă [„Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (5)], cu modificările corespunzătoare, așa cum se arată în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (6).

3. Cele trei căi de administrare principale folosite în studiile de toxicitate cronică sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate și de calea de expunere probabilă în cazul omului. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).

4. Această metodă de testare se axează pe expunerea prin intermediul căii orale, calea cea mai folosită în cadrul studiilor de toxicitate cronică. În timp ce studiile de toxicitate cronică pe termen lung implicând căi de expunere cutanată sau prin inhalare ar putea fi necesare și pentru evaluarea riscului pentru sănătatea umană și/sau în cadrul anumitor regimuri de reglementare, aceste două căi de expunere implică o complexitate tehnică semnificativă. Asemenea studii vor trebui concepute de la caz la caz, deși metoda de testare prezentată aici pentru evaluarea toxicității cronice prin administrare orală ar putea forma baza unui protocol pentru studii de expunere prin inhalare și/sau cutanată, în ceea ce privește recomandările pentru perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc. Sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (6) (7) și pe cale cutanată (6). Capitolul B.8 din prezenta anexă (8) și capitolul B.29 din prezenta anexă (9), împreună cu Ghidul OCDE privind testarea toxicității acute prin inhalare (7) trebuie să fie consultate în mod special la conceperea unor studii mai lungi ce implică expunerea prin inhalare. Capitolul B.9 din prezenta anexă (10) trebuie consultat în cazul efectuării testului prin intermediul căii cutanate.

▼M4

5. Studiul de toxicitate cronică furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată în timpul unei părți considerabile a perioadei de viață a speciei utilizate. Studiul va furniza informații privind efectele toxice ale substanței chimice testate; va indica organele-țintă și posibilitatea de acumulare. De asemenea, studiul poate furniza o estimare a nivelului la care nu se observă efecte adverse, ce poate fi folosită la stabilirea criteriilor pentru expunerea umană. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații posibil.

6. Obiectivele studiilor acoperite de această metodă de testare includ:

— identificarea toxicității cronice a unei substanțe chimice testate;

— identificarea organelor-țintă;

— caracterizarea relației doză-răspuns;

— identificarea nivelului la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL) sau a punctului de pornire pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);

— estimarea efectelor de toxicitate cronică la niveluri de expunere umană;

— furnizarea datelor pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (6).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. În evaluarea caracteristicilor toxicologice ale unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, înainte de efectuarea testului, pentru un protocol mai eficient al testului privind potențialul de toxicitate cronică și pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile care pot contribui la concepția studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimie ale substanței chimice testate; orice informații privind modul de acțiune; rezultatele tuturor testelor de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*; utilizări anticipate și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile și date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; date toxicocinetice disponibile (cinetica pentru doză unică și doză repetată, acolo unde sunt disponibile), precum și date rezultate din studii de expunere repetată. Determinarea toxicității cronice se efectuează doar după ce s-au obținut informațiile inițiale privind toxicitatea din testele de toxicitate la doză repetată pe o perioadă de 28 de zile și/sau 90 de zile. Trebuie să se ia în considerare o abordare de testare a toxicității cronice în etape, ca parte a evaluării generale a potențialelor efecte adverse asupra sănătății a unei anumite substanțe chimice testate (11) (12) (13) (14).

8. Metodele statistice cele mai adecvate pentru analiza rezultatelor, ținând cont de protocolul experimentului și de obiective, se stabilesc înainte de începerea studiului. Aspectele care trebuie luate în considerare sunt, de exemplu, necesitatea ca statisticile să includă ajustarea pentru supraviețuire și analiza în cazul încheierii anticipate pentru unul sau mai multe grupuri. În Ghidul nr. 116 (6) și în Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (15) sunt prezentate orientări privind analizele statistice corespunzătoare și referințe de bază privind metodele statistice acceptate la nivel internațional.

▼M4

9. La efectuarea unui studiu de toxicitate cronică trebuie să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile din Ghidul OCDE nr. 19 privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (16), în special punctul 62 al documentului. Acest punct stipulează că „*În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, conducând la deteriorarea în continuare a stării, trebuie să se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia trebuie să includă considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, trebuie să crească frecvența observărilor, după cum este necesar. De asemenea, fără a afecta negativ scopul testului, se poate întrerupe temporar dozarea sau se poate reduce doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința.*”

10. În Ghidul nr. 116 (6), precum și în două publicații ale International Life Sciences Institute (17) (18) se pot găsi orientări detaliate privind principiile de selectare a dozei pentru studii de toxicitate cronică și carcinogenitate, precum și discuții pe această temă. Strategia de selectare a dozei de bază depinde de obiectivul principal sau obiectivele principale ale studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor de dozare adecvate trebuie să se atingă un echilibru între depistarea pericolelor, pe de-o parte, și caracterizarea răspunsurilor la doză redusă și relevanța lor, pe de altă parte. Acest lucru este relevant în special în cazul în care se efectuează un studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) (punctul 11).

11. Trebuie să se aibă în vedere efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) în locul efectuării separate a unui studiu de toxicitate cronică (această metodă de testare B.30) și a unui studiu de carcinogenitate (capitolul B.32 din prezenta anexă). Testul combinat oferă o eficiență mai mare din punct de vedere al timpului și costului, comparativ cu efectuarea a două studii separate, fără a compromite calitatea datelor din faza de toxicitate cronică sau de carcinogenitate. Cu toate acestea, trebuie să se acorde multă atenție principiilor de selectare a dozei (punctele 9 și 20-25) la efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) și se recunoaște, de asemenea, faptul că pot fi necesare studii separate în anumite cadre de reglementare.

12. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul nr. 116 (6).

PRINCIPIUL TESTULUI

13. Substanța chimică testată este administrată zilnic, în doze graduale, mai multor grupuri de animale utilizate în scopuri experimentale, de obicei pe o perioadă de 12 luni, deși se pot alege durate mai mari sau mai scurte, în funcție de cerințele de reglementare (a se vedea punctul 33). Această durată se alege suficient de mare pentru a permite manifestarea oricăror efecte cumulative ale toxicității, fără efectele perturbatoare date de modificările geriatrice. Abaterile de la durata de expunere de 12 luni trebuie justificate, în special în cazul unor durate mai scurte. De obicei, substanța chimică testată se administrează pe cale orală, deși poate fi adecvată testarea prin inhalare sau pe cale cutanată. Protocolul studiului include, de asemenea, una sau mai multe sacrificări pe parcurs, de exemplu la 3 și 6 luni, și se pot include grupuri suplimentare de animale, pentru a lua în considerare aceasta (a se vedea punctul 19). În perioada administrării, animalele se țin sub observație atentă, în scopul de a constata semnele de toxicitate. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în cursul testului trebuie să fie supuse unei autopsii, iar la încheierea testului se eutanasiază și se autopsiază animalele care au supraviețuit.

▼M4

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

14. Această metodă de testare acoperă, în principal, evaluarea toxicității cronice la rozătoare (a se vedea punctul 2), deși se recunoaște faptul că pot fi necesare studii similare pe nerozătoare, în cadrul anumitor regimuri de reglementare. Alegerea speciei trebuie să fie justificată. Protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică pe specii de nerozătoare, în cazul în care sunt necesare, se bazează pe principiile subliniate în această metodă de testare și pe cele din capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (5). Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).

15. În această metodă de testare, specia preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Șobolanii și șoarecii au fost modelele experimentale preferate din cauza duratei lor de viață relativ scurte, utilizării lor pe scară largă în studii de farmacologie și toxicologie, receptivității lor la inducerea tumorilor și disponibilității unor sușe cu nivel suficient de caracterizare. Ca o consecință a acestor caracteristici, este disponibil un volum mare de informații privind fiziologia și patologia lor. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Studiul de toxicitate cronică trebuie efectuat pe animale din aceeași sușă și sursă cu cele folosite în studiile preliminare de toxicitate, de durată mai scurtă. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante.

Condiții de adăpostire și de hrănire

16. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; se ia în considerare adăpostirea individuală a animalelor doar dacă există o justificare științifică (19) (20) (21). Cuștile trebuie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Temperatura camerei în care se află animalele utilizate în scop experimental trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, furnizându-se o cantitate nelimitată de apă potabilă. Regimul alimentar trebuie să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei testate, iar conținutul de contaminanți alimentari care ar putea influența rezultatul testului, printre care reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fitoestrogeni, metale grele și micotoxine, dar fără limitare la acestea, trebuie să fie cât mai redus posibil. Informațiile analitice privind nutrienții și nivelurile de contaminanți din regimul alimentar trebuie să fie generate periodic, cel puțin la începutul studiului și atunci când există o modificare a grupului folosit, și trebuie să fie incluse în raportul final. În mod similar, trebuie să se furnizeze informații analitice privind apa potabilă folosită în cadrul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor, în cazul administrării substanței chimice testate prin alimentație.

Pregătirea animalelor

17. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. În cazul rozătoarelor, administrarea trebuie să înceapă cât mai curând posibil după înțărcare și aclimatizare și, preferabil, înainte de vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele testate trebuie să se precizeze specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, variațiile de greutate între animalele utilizate pentru fiecare sex

▼M4

trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie a tuturor animalelor din cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. După randomizare, nu trebuie să existe diferențe semnificative între greutățile corporale medii ale grupurilor din cadrul fiecărui sex. În cazul în care există diferențe semnificative statistic, se repetă etapa de randomizare, dacă este posibil. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare și este marcat permanent cu acest număr prin tatuare, implantare de microcip sau altă metodă adecvată.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

18. Se folosesc ambele sexe. Trebuie să se utilizeze un număr suficient de animale astfel încât la încheierea studiului să fie disponibile suficiente animale în fiecare grup pentru evaluarea biologică și statistică adecvată. Pentru rozătoare, de obicei se folosesc minimum 20 de animale din fiecare sex și grup, la fiecare nivel de dozare, iar pentru nerozătoare se recomandă minimum 4 animale din fiecare sex și grup. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale suplimentare în fiecare grup de doză, pentru efectuarea tuturor determinărilor hematologice necesare.

Sacrificări pe parcurs, grupuri satelit și animale santinelă

19. Studiul poate prevedea sacrificări pe parcurs (minimum 10 animale/sex/lot), de exemplu la 6 luni, pentru a asigura informații privind evoluția modificărilor toxicologice și informații mecaniciste, dacă există justificare științifică. În cazul în care asemenea informații sunt deja disponibile din studii anterioare de toxicitate la doză repetată pentru substanța chimică testată, este posibil ca sacrificările pe parcurs să nu fie justificate din punct de vedere științific. Pot fi incluse grupuri satelit pentru monitorizarea reversibilității modificărilor toxicologice induse de substanța chimică testată studiată; de obicei, acestea se limitează la nivelul cel mai ridicat al dozei plus grupul martor. De asemenea, în timpul studiului se poate include un grup suplimentar de animale santinelă (de obicei, 5 animale din fiecare sex), pentru monitorizarea stării de boală, dacă este necesar (22). Dacă sunt planificate sacrificări pe parcurs sau includerea de grupuri satelit sau santinelă, numărul de animale prevăzute în protocolul studiului trebuie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de sfârșitul testului. În mod normal, aceste animale trebuie să fie supuse acelorași observații, incluzând greutatea corporală, consumul de hrană/apă, măsurători hematologice și de biochimie clinică și investigații patologice, ca și animalele din studiul de toxicitate cronică, dar se poate prevedea (la grupurile de animale sacrificate pe parcurs) faptul că măsurătorile se limitează la indicatori de bază, specifici, cum ar fi neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea.

Grupuri de doze și dozare

20. În Ghidul nr. 116 (6) sunt furnizate orientări privind toate aspectele legate de selectarea dozelor și intervalele dintre nivelurile de dozare. Se utilizează minimum trei niveluri de dozare și un grup martor în paralel, în afara cazului în care se efectuează un test la valori-limită (a se vedea punctul 27). De regulă, nivelul dozelor se stabilește în funcție de rezultatele studiilor cu doză repetată pe termen mai scurt sau ale studiilor preliminare și trebuie să ia în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțe înrudite.

▼M4

21. Cu excepția situației în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, cel mai mare nivel de dozare se alege, de regulă, pentru a identifica principalele organe-țintă și efectele toxice, evitându-se în același timp suferința, toxicitatea severă, morbiditatea sau moartea. Luând în considerare factorii prezentați la punctul 22 de mai jos, nivelul cel mai mare de dozare se alege pentru a produce dovezi de toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %).

22. Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), se poate alege o doză maximă mai mică decât doza care furnizează dovada toxicității, de exemplu, în cazul în care o doză provoacă un efect advers îngrijorător care totuși are un efect redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale. Doza maximă nu trebuie să depășească 1 000 mg/kg greutate corporală/zi (doza-limită, a se vedea punctul 27).

23. Nivelurile dozelor și intervalul între nivelurile de dozare se pot alege astfel încât să se stabilească o relație doză-răspuns și un NOAEL sau alt rezultat intenționat al studiului, de exemplu o BMD (a se vedea punctul 25) la nivelul dozei minime. Printre factorii care trebuie să fie luați în considerare la stabilirea dozelor inferioare se numără panta anticipată a curbei doză-răspuns, dozele la care se pot produce modificări importante în metabolism sau în modul de acțiune toxică a substanței, nivelul la care se anticipează un prag sau nivelul la care este anticipat punctul de pornire pentru extrapolarea la doză redusă.

24. Intervalele dintre nivelurile de dozare vor depinde de caracteristicile substanței chimice testate și nu pot fi prescrise în această metodă de testare, dar o performanță bună a testului se obține în mod frecvent cu un factor de 2 până la 4 la formarea seriei descrescătoare a dozelor, iar adăugarea unui al patrulea grup de probă este adesea preferabilă folosirii unor intervale cu factori foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze. În general trebuie să se evite utilizarea unor factori peste 10 și, în cazul în care sunt utilizați, trebuie să se prezinte justificarea.

25. Așa cum se arată în Ghidul nr. 116 (6), aspectele care trebuie luate în considerare la selectarea dozei includ:

— neliniarități sau puncte de inflexiune cunoscute sau prezumptive în relația doză-răspuns;

— aspecte toxicocinetice și intervale ale dozelor în care intervin sau nu intervin inducția metabolică, saturația sau neliniaritatea între dozele externe și interne;

— leziuni precursoare, marcatori de efect sau indicatori ai acțiunii unor procese biologice de bază;

— aspecte de bază (sau prezumptive) ale modului de acțiune, de exemplu doze la care începe să apară citotoxicitatea, la care sunt perturbate nivelurile hormonale, la care sunt excedate mecanismele homeostazice etc.;

— regiunile curbei doză-răspuns unde este necesară o estimare deosebit de precisă, de exemplu în domeniul BMD anticipate sau al unui prag anticipat;

— considerații privind nivelurile de expunere umană anticipate.

▼M4

26. Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței testate se utilizează un vehicul. Cu excepția administrării substanței chimice testate, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum de vehicul utilizat pentru grupurile de dozare. Dacă substanța chimică testată se administrează în hrană și determină diminuarea semnificativă a consumului de hrană din cauza savorii reduse, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel.

27. Atunci când se poate anticipa, pe baza informațiilor din studiile preliminare, că un test efectuat la o doză unică, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, folosind metodele de testare descrise pentru acest studiu, este improbabil să producă efecte adverse și dacă nu este anticipată toxicitatea în baza datelor existente pentru substanțe înrudite structural, se consideră că nu este necesar un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite. Se poate aplica o limită de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

Pregătirea dozelor și administrarea substanței chimice testate

28. Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, prin alimente ori apa potabilă, sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6). Alegerea căii și metodei de administrare depinde de scopul studiului, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate, de biodisponibilitatea sa și de calea și metoda de expunere predominante în cazul omului. Trebuie să se prezinte justificarea pentru calea și metoda de administrare alese. Din rațiuni care țin de bunăstarea animalelor, gavajul oral se alege, de obicei, doar pentru acei agenți la care această cale și metodă de administrare reprezintă, în mod rezonabil, o expunere umană potențială (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțe din hrană sau mediu, inclusiv pesticide, administrarea se face, de obicei, prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile. Cu toate acestea, pentru unele scenarii, de exemplu expunerea ocupațională, pot fi mai adecvate alte căi de administrare.

29. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței chimice testate, care i-ar putea afecta caracteristicile toxice; efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Trebuie să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței chimice testate și omogenitatea soluțiilor sau regimurilor alimentare (după caz) în condițiile administrării (de exemplu, prin hrană).

30. În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. În studiile de toxicitate pe termen lung folosind administrarea prin hrană, concentrația substanței testate în hrană nu trebuie să depășească, de obicei, o limită superioară de 5 % din totalul regimului alimentar, pentru a evita dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată este administrată în alimente, se poate folosi fie o concentrație constantă în hrană (mg/kg alimente sau ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului (mg/kg greutate corporală), calculată săptămânal. Trebuie să se precizeze alternativa utilizată.

▼M4

31. În cazul administrării orale, animalele primesc zilnic doza de substanță chimică testată (șapte zile pe săptămână), de obicei pe o perioadă de 12 luni (a se vedea și punctul 33), deși poate fi necesară o durată mai mare, în funcție de cerințele de reglementare. Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie să fie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt tratate de obicei cu substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, așa cum se specifică în capitolul B.9 din prezenta anexă (10), pe o perioadă de 12 luni. Expunerea prin inhalare se face timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar se poate folosi și expunerea timp de 5 zile pe săptămână, dacă este justificată. Perioada de expunere va fi, de obicei, de 12 luni. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii, doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. În cazul în care durata expunerii este sub 6 ore pe zi, trebuie să se prezinte o justificare. A se vedea și capitolul B.8 din prezenta anexă (8).

32. Când substanța chimică testată este administrată prin gavaj, ea se administrează animalelor folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la momente similare în fiecare zi. De obicei, se administrează o doză unică, o dată pe zi; în cazul în care o substanță are efect iritant local, rata dozei zilnice poate fi menținută prin administrare ca doză fracționată (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului testat. Volumul se menține cât mai redus posibil și de obicei nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală pentru rozătoare (22). Variațiile volumului administrat trebuie să fie reduse la minimum prin modificarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele potențial corozive sau iritante constituie o excepție și trebuie diluate pentru a evita efecte locale grave. Trebuie să se evite testarea la concentrații potențial corozive pentru tractul gastrointestinal.

Durata studiului

33. În principal, această metodă de testare este concepută ca studiu de toxicitate cronică pe 12 luni, dar protocolul permite și se poate aplica unor studii cu durate mai scurte (de exemplu, 6 la 9 luni) sau mai lungi (de exemplu, 18 la 24 de luni), în funcție de cerințele regimurilor de reglementare specifice sau în scopuri mecaniciste specifice. Abaterile de la durata de expunere de 12 luni trebuie să fie justificate, în special în cazul unor durate mai scurte. Grupurile satelit incluse pentru monitorizarea reversibilității modificărilor toxicologice induse de substanța chimică testată trebuie să fie menținute fără administrare de doze pe o perioadă de minimum 4 săptămâni și nu mai mult de o treime din durata totală a studiului după încetarea expunerii. Orientări suplimentare, inclusiv considerații privind supraviețuirea în cadrul studiului, sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (6).

OBSERVAȚII

34. Toate animalele trebuie să fie examinate pentru constatarea simptomelor de morbiditate și mortalitate, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv în zilele de weekend și sărbători. Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după dozare, în cazul administrării prin gavaj.

▼M4

35. Se recomandă efectuarea de observații clinice detaliate asupra tuturor animalelor, cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a putea face comparații în cazul aceluiași individ) și la sfârșitul primei săptămâni de studiu, apoi o dată pe lună. Protocolul pentru observații trebuie organizat astfel încât variațiile între observatorii independenți să fie minimizate și independente de grupul de testare. Aceste observații se recomandă să fie făcute în afara cuștii, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele trebuie să fie consemnate cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Trebuie acționat astfel încât să se asigure că variațiile privind condițiile de observare sunt minime. Simptomele observate includ modificări ale pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția secrețiilor și excrețiilor, precum și activitatea autonomă (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilelor, respirație neobișnuită), fără limitare la acestea. Trebuie să fie consemnate, de asemenea, schimbările apărute în mers, ținută și răspunsul la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice și tonice, a stereotipiilor (de exemplu, îngrijirea corporală excesivă, mersul circular repetat) sau a comportamentelor bizare (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi) (24).

36. Toate animalele sunt supuse unei examinări oftalmologice cu ajutorul unui oftalmoscop sau a unui echipament similar, înainte de prima administrare a substanței testate. La încheierea studiului, această examinare se face, de preferință, la toate animalele, dar trebuie făcută cel puțin la grupurile cu doză de nivel mare și grupurile martor. Dacă se constată modificări ale ochilor legate de tratament, toate animalele trebuie să fie examinate. În cazul în care analiza structurală sau alte informații sugerează toxicitate oculară, se mărește frecvența examinărilor oculare.

37. Pentru substanțe chimice testate la care testele anterioare de toxicitate la doză repetată de 28 și/sau 90 de zile au indicat potențialul de a produce efecte neurotoxice, se pot face opțional evaluări ale reactivității senzoriale la stimuli de diferite tipuri (24) (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (25) (26) (27), evaluarea forței prehensile (28) și evaluarea activității motorii (29) înainte de începerea studiului și la perioade de 3 luni de la începerea studiului, până la 12 luni inclusiv, precum și la terminarea studiului (dacă durează mai mult de 12 luni). Detalii suplimentare referitoare la procedurile de urmat sunt prezentate în referințele bibliografice respective. Se pot folosi și metode diferite de cele menționate.

38. Pentru substanțe chimice testate la care testele anterioare de toxicitate la doză repetată de 28 și/sau 90 de zile au indicat potențialul de a produce efecte imunotoxice, se pot efectua opțional la finalizare investigații suplimentare privind acest efect.

Greutatea corporală, consumul de hrană și apă și eficiența hranei

39. Toate animalele se cântăresc la începutul tratamentului, cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună după aceea. Măsurătorile consumului de hrană și ale eficienței hranei se fac cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior, în cazul în care substanța este administrată în apa potabilă. Măsurătorile consumului de apă se iau în considerare și la studiile în care băutul apei suferă modificări.

▼M4

Hematologia și biochimia clinică

40. La studiile pe rozătoare, examinările hematologice se fac pe minimum 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, la 3, 6 și 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă durează mai mult de 12 luni), folosind întotdeauna aceleași animale. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale satelit pentru efectuarea tuturor determinărilor hematologice necesare (a se vedea punctul 18). La studiile pe nerozătoare, probele se vor preleva de la mai puține animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și grup, la studiile pe câini), la momente intermediare de prelevare și la încheiere, așa cum s-a arătat pentru rozătoare. Măsurătorile la 3 luni, atât pentru rozătoare cât și pentru nerozătoare, nu trebuie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra parametrilor hematologici la studiul anterior de 90 de zile, efectuat la doze de niveluri comparabile. Probele de sânge sunt prelevate dintr-un punct determinat, de exemplu prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital, sub anestezie.

41. Se investighează următoarea listă de parametri (30): numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de eritrocite, numărul de plachete, concentrația hemoglobinei, hematocritul, volumul corpuscular mediu (MCV), concentrația medie de hemoglobină corpusculară (MCHC), timpul de protrombină și timpul de protrombină parțial activat. Alți parametri hematologici, de exemplu corpii Heinz sau morfologia atipică a eritrocitelor sau methemoglobina, se pot măsura, după caz, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În ansamblu, se adoptă o abordare flexibilă, în funcție de efectul observat și/sau anticipat al unei anumite substanțe chimice testate. În cazul în care substanța chimică testată are vreun efect asupra sistemului hematopoietic, se mai pot indica numărul de reticulocite și citologia măduvei osoase, dar aceste examinări nu trebuie să fie efectuate în mod obișnuit.

42. Determinările de biochimie clinică în scopul determinării efectelor toxice majore în țesuturi și, în special, a efectelor asupra rinichiului și ficatului sunt practicate pe probe de sânge obținute de la cel puțin 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, la aceleași intervale cu cele specificate pentru investigațiile hematologice, folosind întotdeauna aceleași animale. La studiile pe șoareci pot fi necesare animale satelit pentru efectuarea tuturor determinărilor de biochimie clinică necesare. La studiile pe nerozătoare, probele se vor preleva de la mai puține animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și grup, la studiile pe câini), la momente intermediare de prelevare și la încheiere, așa cum s-a arătat pentru rozătoare. Măsurătorile la 3 luni, atât pentru rozătoare cât și pentru nerozătoare, nu trebuie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra parametrilor de biochimie clinică la studiul anterior de 90 de zile efectuat la doze de niveluri comparabile. Se recomandă privarea de hrană a animalelor pe timpul nopții (cu excepția șoarecilor) înainte de prelevarea probelor de sânge. Se investighează parametrii din lista următoare (30): glucoză, uree (azot ureic), creatinină, proteină totală, albumină, calciu, sodiu, potasiu, colesterol total, cel puțin două teste adecvate pentru evaluarea hepatocelulară (alanin aminotransferază, aspartat alanin aminotransferază, glutamat dehidrogenază, acizi biliari totali) (31) și cel puțin două teste adecvate pentru evaluarea hepatobiliară (fosfatază alcalină, gama-glutamil transferază, 5'-nucleotidază, bilirubină totală, acizi biliari totali) (31). Alți parametri biochimici, de exemplu trigliceridele à jeun, hormonii specifici și colinesteraza se pot măsura, după caz, în funcție de toxicitatea substanței testate. În general, este nevoie de o abordare flexibilă, în funcție de efectele constatate și scontate ale substanței testate în cauză.

▼M4

43. Determinările de analize urinare se efectuează pe cel puțin 10 masculi și 10 femele din fiecare grup, pe probe recoltate la aceleași intervale ca pentru analizele hematologice și biochimice. Măsurătorile la 3 luni nu trebuie să fie efectuate dacă nu s-a observat niciun efect asupra analizei de urină la studiul anterior de 90 de zile efectuat la doze de niveluri comparabile. Următoarea listă de parametri a fost inclusă într-o recomandare a experților privind studiile de patologie clinică (30): aspect, volum, osmolalitate sau densitate, pH, proteină totală și glucoză. Alte determinări includ corpi cetonici, urobilinogen, bilirubină și hemoragii oculte. Se pot folosi și alți parametri, dacă este necesar să se extindă investigarea efectului (efectelor) observat(e).

44. De regulă, se consideră că, pentru studiile pe câini, variabilele de referință ale parametrilor hematologici și biochimici sunt necesare înainte de tratament, dar acestea nu trebuie determinate în cazul studiilor pe rozătoare (30). Cu toate acestea, dacă datele de referință istorice (a se vedea punctul 50) sunt necorespunzătoare, trebuie să se aibă în vedere generarea unor asemenea date.

Patologia

Autopsia

45. În mod normal, toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavităților craniană, toracică și abdominală, precum și a conținutului acestora. Cu toate acestea, se poate prevedea (la grupurile de sacrificare pe parcurs sau satelit) ca măsurătorile să se limiteze la indicatori de bază specifici, de exemplu neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea (a se vedea punctul 19). Aceste animale nu trebuie supuse autopsiei și procedurilor ulterioare descrise la punctele următoare. Animalele santinelă pot necesita autopsierea, de la caz la caz, decizia fiind la aprecierea conducătorului studiului.

46. Se măsoară greutatea organelor pentru toate animalele, în afară de cele excluse conform ultimei părți a punctului 45. Glandele suprarenale, creierul, epididimul, inima, rinichii, ficatul, ovarele, splina, testiculele, glanda tiroidă (cântărită după fixare, cu glandele paratiroide) și uterul fiecărui animal (cu excepția celor găsite muribunde și/sau a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite în stare proaspătă, cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea. La studiile pe șoareci, cântărirea glandelor suprarenale este opțională.

47. Următoarele țesuturi se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat pentru țesut și pentru examinarea histopatologică ulterioară intenționată (32) (țesuturile trecute între paranteze pătrate sunt opționale):

toate leziunile macroscopice	inimă	pancreas	stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)
glande suprarenale	ileon	glande paratiroide	[dinți]
aortă	jejun	nervi periferici	testicule
creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte)	rinichi	hipofiză	timus
cec	glande lacrimale (extraorbitale)	prostată	tiroidă
col uterin	ficat	rect	[limbă]

▼M4

glande coagulante	plămân	glande salivare	trahee
colon	noduli limfatici (superficiali și de profunzime)	veziculă seminală	vezică urinară
duoden	glande mamare (obligatoriu pentru femele și, dacă se pot diseca vizibil, de la masculi)	mușchi scheletici	uter (inclusiv colul uterin)
epididim	[căi respiratorii superioare, inclusiv nasul, cornetele nazale și sinusurile paranazale]	piele	[ureter]
ochi (inclusiv retina)	esofag	măduva spinării (la trei niveluri: cervical, toracic și lombar)	[uretră]
[femur cu articulație]	[bulb olfactiv]	splină	vagin
vezica biliară (pentru alte specii în afară de șobolan)	ovar	[stern],	secțiune de măduvă osoasă și/sau aspirat proaspăt de măduvă
glandă lacrimală			

În cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se conservă ambele organe. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile sale cunoscute. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, se păstrează lista organelor specificată pentru calea orală și este esențială prelevarea specifică și conservarea pielii de la locul de aplicare. În studiile de inhalare, lista de țesuturi conservate și examinate din căile respiratorii urmează recomandările capitolului B.8 din prezenta anexă (8) și ale capitolului B.29 din prezenta anexă (9). Pentru alte organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specific din căile respiratorii) se examinează lista organelor specificate pentru calea de administrare orală.

Examenul histopatologic

48. Sunt disponibile orientări privind cele mai bune practici în desfășurarea studiilor de patologie toxicologică (32). Examinările histopatologice minime sunt:

— toate țesuturile din grupurile tratate cu doza maximă și din grupurile martor;

— toate țesuturile de la animalele care au murit sau au fost sacrificate în cursul studiului;

— toate țesuturile prezentând anomalii macroscopice;

— țesuturile-țintă sau țesuturile care au prezentat modificări legate de tratamentul din grupul tratat cu doză maximă, de la toate animalele din toate grupurile pentru celelalte doze;

— în cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, trebuie să se examineze ambele organe.

▼**M4**

DATE ŞI RAPORT

Date

49. Se furnizează date individuale despre animale pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup testat indicându-se numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umane și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor ce prezintă leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune. Tabelele cu date sumare prezintă mediile și deviațiile standard (pentru date de testare continue) la animalele care prezintă efecte toxice sau leziuni, plus clasificarea leziunilor.

50. Datele istorice de control pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu în cazul în care există indicații că datele provenite de la grupurile martor studiate în paralel nu sunt în concordanță, într-o măsură substanțială, cu datele recente de la animale din grupul martor din aceeași unitate/colonie de testare. În cazul în care sunt evaluate, datele istorice de control se transmit de la același laborator și se referă la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă cu cele generate în cursul unei perioade de cinci ani înainte de studiul în cauză.

51. Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de concepție a studiului (punctul 8). Selecția ia în considerare ajustări în funcție de supraviețuire, dacă este necesar.

Raportul de testare

52. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța chimică testată:

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare;

— sursa substanței;

— numărul lotului;

— certificatul de analiză chimică.

Vehiculul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

Animalele testate:

— specia/sușa folosite și justificarea alegerii făcute;

— numărul, vârsta și sexul animalelor la începutul testului;

▼M4

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutului testului.

Condițiile de testare:

— justificarea căii de administrare și a dozelor alese;

— dacă este cazul, metodele statistice folosite pentru analiza datelor;

— detalii privind formularea/includerea în hrană a substanței testate;

— date analitice privind concentrația atinsă, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— calea de administrare și detalii privind administrarea substanței testate;

— pentru studiile de inhalare, dacă expunerea a fost în zona nasului sau a întregului corp;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa potabilă (mg/kg sau ppm) la doza reală, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele):

— date privind supraviețuirea;

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană, calcule privind eficiența hranei, dacă s-au efectuat, precum și consumul de apă, dacă este cazul;

— rezultate privind răspunsul toxic, pe sexe și niveluri ale dozelor, inclusiv simptome de toxicitate;

— natura, incidența (și, dacă s-a evaluat, gravitatea) și durata semnelor clinice (dacă sunt reversibile sau permanente);

— rezultatele examenului oftalmologic;

— teste hematologice;

— teste de biochimie clinică;

— analize de urină;

— rezultatele tuturor investigațiilor de neurotoxicitate sau imunotoxicitate;

— greutatea corporală finală;

— greutățile organelor (și rapoartele lor, dacă este cazul);

— concluziile autopsiei;

— o descriere detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice în legătură cu tratamentul;

— date referitoare la absorbție, dacă este cazul.

▼**M4**

Interpretarea statistică a rezultatelor, după caz.

Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:

— relații doză-răspuns;

— considerarea tuturor informațiilor privind modul de acțiune;

— discutarea tuturor abordărilor privind modelarea;

— determinarea valorilor BMD, NOAEL sau LOAEL;

— date istorice de control;

— relevanța pentru om.

Concluzii.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.

(6) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 zile”.

(9) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.

(10) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, JO L 276, 20.10.2010, p. 33.

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanță chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼B

B.31. **STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII INTRAUTERINE**

1. **METODĂ**

Această metodă corespunde Orientării 414 (2001) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare a toxicității asupra dezvoltării intrauterine este concepută pentru a furniza informații generale privind efectele expunerii prenatale asupra animalelor de experiență gestante și asupra dezvoltării intrauterine a organismului; printre acestea se pot număra evaluarea efectelor asupra mamei, precum și moartea, anomalii structurale sau modificările de creștere la fetus. Deficiențele funcționale, deși constituie o parte importantă a dezvoltării, nu sunt incluse în această metodă de testare. Ele pot face obiectul unui studiu separat sau al unei completări a acestui studiu, utilizând metoda privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării. Pentru informații privind testarea deficiențelor funcționale și alte efecte postnatale se consultă Metoda de testare a toxicității asupra funcției de reproducere la două generații și studiul privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării, după caz.

Este posibil să fie necesară o adaptare a acestei metode de testare la cazurile individuale, pe baza cunoștințelor specifice privind, de exemplu, proprietățile fizico-chimice sau toxicologice ale substanței de testat. Astfel de adaptări sunt acceptabile, în cazurile în care date științifice concludente sugerează că adaptarea va conduce la obținerea mai multor informații din test. În acest caz, datele științifice se documentează în detaliu în raportul studiului.

1.2. DEFINIȚII

Toxicologia dezvoltării: studiul efectelor adverse asupra organismului în curs de dezvoltare care ar putea fi provocate de expunerea înainte de concepție, în cursul dezvoltării intrauterine sau postnatal, până în momentul maturizării sexuale. Principalele manifestări ale toxicității dezvoltării sunt (1) moartea organismului, (2) o anomalie structurală, (3) o modificare a creșterii și (4) o deficiență funcțională. Până acum, toxicitatea dezvoltării a fost denumită deseori teratologie.

Efect advers: orice deviere de la situația de referință care are legătură cu tratamentul și care scade abilitatea unui organism de a supraviețui, de a se reproduce sau de a se adapta la mediu. În ceea ce privește toxicologia dezvoltării, în sensul său cel mai larg, aceasta include orice efect care interferează cu dezvoltarea normală a produsului de concepție atât înainte, cât și după naștere.

Modificare a creșterii: o modificare care afectează un organ, greutatea sau dimensiunea corporale ale descendentului.

Modificări (anomalii): modificări structurale în dezvoltare, care includ malformații și variații (28).

Malformație/Anomalie majoră: modificare structurală considerată dăunătoare animalului (poate fi chiar letală) și, de obicei, rară.

▼B

Variație/Anomalie minoră: modificare structurală considerată puțin sau deloc dăunătoare animalului; poate fi temporară și poate interveni relativ frecvent la populația martor.

Produs de concepție: ansamblul produselor unui ovul fecundat în orice stadiu de dezvoltare, de la fertilizare până la naștere, inclusiv membranele extra-embrionare, precum și embrionul sau fetusul.

Implantare (nidație): atașarea blastocistului în membrana epitelială a uterului, inclusiv penetrarea sa prin epiteliul uterin, și fixarea sa în endometru.

Embrion: stadiul precoce sau de dezvoltare al oricărui organism, în special produsul în curs de dezvoltare al fertilizării unui ovul după apariția axei longitudinale și până la apariția tuturor structurilor majore.

Embriotoxicitate: nocivitate pentru structura, dezvoltarea, creșterea și/sau viabilitatea normale ale unui embrion.

Fetus: descendentul nenăscut în perioada post-embrionară.

Fetotoxicitate: nocivitate pentru structura, dezvoltarea, creșterea și/sau viabilitatea normale ale unui fetus.

Avort: expulzarea prematură din uter a unui produs de concepție: a embrionului sau a unui fetus neviabil.

Resorbție: fenomenul prin care un produs de concepție care a decedat după implantarea în uter este sau a fost resorbit.

Resorbție precoce: dovada implantării fără un embrion/fetus detectat.

Resorbție tardivă: embrion sau fetus decedat cu modificări externe degenerative.

NOAEL: abreviere pentru nivelul dozei fără efect advers (*no-observed-adverse-effect level*); cel mai ridicat nivel al dozei sau al expunerii la care nu se observă efecte adverse provocate de tratament.

1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

În mod normal, substanța de testat se administrează animalelor gestante cel puțin de la implantare până în ziua anterioară celei planificate pentru sacrificare, care se stabilește cât mai aproape posibil de ziua normală a fătării fără să existe riscul de pierdere a datelor din cauza unei fătări premature. Metoda de testare nu are ca scop doar studierea perioadei de organogeneză (de exemplu, zilele 5-15 la rozătoare și zilele 6-18 la iepure), ci și examinarea efectelor din perioada de preimplantare, dacă este cazul, pe întreaga durată a perioadei de gestație, până în ziua anterioară cezarienei. Cu scurt timp înainte de cezariană, se sacrifică femelele, se examinează conținutul uterin și se examinează fetușii pentru detectarea anomaliilor externe vizibile și a modificărilor țesuturilor moi și ale scheletului.

▼B

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Selectarea speciei de animale**

Se recomandă ca testele să se efectueze pe specia cea mai relevantă și să se utilizeze specii și sușe de laborator care sunt cel mai des utilizate în teste privind toxicitatea asupra dezvoltării intrauterine. Specia preferată de rozătoare este șobolanul, iar specia preferată de nerozătoare este iepurele. Dacă se utilizează altă specie, decizia se motivează.

1.5.2. **Condiții de adăpostire și de hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență, se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C) pentru rozătoare și de 18 °C (± 3 °C) pentru iepuri. Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Deși este de preferat adăpostirea individuală a animalelor împerecheate, adăpostirea în grupuri puțin numeroase este, de asemenea, acceptabilă.

1.5.3. **Pregătirea animalelor**

Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 5 zile înainte și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Pentru animalele de experiență se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și/sau vârsta. Se recomandă ca animalele din toate grupurile testate să aibă, în cea mai mare măsură posibilă, greutăți și vârste apropiate. La fiecare nivel al dozei se utilizează femele adulte tinere, nulipare. Femelele se împerechează cu masculi din aceeași specie și sușă, evitându-se împerecherile între animale cosangvine. La rozătoare, ziua 0 de gestație este ziua în care se observă un dop vaginal și/sau spermă; la iepuri, ziua 0 de gestație este, de obicei, ziua copulației sau a însămânțării artificiale, dacă se utilizează această tehnică. Femelele împerecheate se distribuie la întâmplare în grupurile martor și de tratament. Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea lor să fie reduse la minimum. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare. Femelele împerecheate se distribuie la întâmplare în grupurile martor și de tratament, iar dacă împerecherea se face în loturi, animalele din același lot se distribuie uniform în toate grupurile. În mod similar, femelele inseminate de același mascul se distribuie uniform în toate grupurile.

1.6. MOD DE LUCRU

1.6.1. **Numărul și sexul animalelor**

Fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de femele pentru a obține aproximativ 20 de femele cu puncte de implantare la autopsie. Grupurile cu sub 16 animale cu puncte de implantare riscă să fie inadecvate. Mortalitatea maternă nu invalidează obligatoriu studiul, cu condiția să nu depășească aproximativ 10 %.

▼B

1.6.2. **Pregătirea dozelor**

Dacă se foloseşte un vehicul sau un alt aditiv pentru facilitarea dozării, se iau în considerare următoarele caracteristici: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului şi retenției sau excreției substanței de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care i-ar putea modifica caracteristicile toxice; şi efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării nutriționale a animalelor. Vehiculul trebuie să nu fie toxic asupra dezvoltării şi să nu aibă efecte asupra reproducerii.

1.6.3. **Dozare**

În mod normal, substanța de testat se administrează zilnic de la implantare (de exemplu, ziua 5 după împerechere) până în ziua anterioară celei planificate pentru cezariană. În cazul în care studiile preliminare, dacă sunt disponibile, nu indică un risc ridicat de pierdere preimplantare, tratamentul poate fi extins astfel încât să includă întreaga perioadă de gestație, de la împerechere până în ziua anterioară sacrificării planificate. Este binecunoscut faptul că manipularea inadecvată şi stresul în perioada gestației pot genera pierderi prenatale. Ca măsură de prevenire a pierderilor prenatale cauzate de factori fără legătură cu tratamentul, se evită manipularea inutilă a animalelor gestante, precum şi stresul cauzat de factori externi, precum zgomotul.

Se utilizează cel puțin trei doze diferite şi un grup martor paralel. În grupurile martor şi de tratament se distribuie uniform animale sănătoase. Dozele se administrează eşalonat astfel încât efectele toxice să fie graduale. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizică/chimică sau proprietățile biologice ale substanței, doza cea mai mare se alege astfel încât să inducă toxicitate asupra dezvoltării şi/sau toxicitate asupra mamei (semne clinice sau o scădere a greutății corporale), dar nu decesul sau o suferință profundă. Cel puțin una dintre dozele intermediare trebuie să producă efecte toxice minime, observabile. Doza cea mai mică nu trebuie să producă niciun efect toxic asupra mamei sau asupra dezvoltării. Se selectează o serie descrescătoare a nivelurilor dozelor pentru a demonstra o eventuală relație doză-efect şi nivelul dozei fără efect advers vizibil (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru şi este deseori de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze. Deşi obiectivul este stabilirea unui NOAEL matern, sunt, de asemenea, acceptabile studiile care nu stabilesc un astfel de nivel (1).

Pentru selectarea nivelurilor dozelor se ține seama de datele existente privind toxicitatea, precum şi de informațiile suplimentare privind metabolismul şi toxicocinetica substanței de testat sau a materialelor înrudite. Informațiile în cauză se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra că regimul de dozare este adecvat.

Se utilizează un grup martor paralel. Acest grup este supus unui tratament simulat sau unui tratament exclusiv cu vehicul, în cazul în care pentru administrarea substanței se utilizează un vehicul. Tuturor grupurilor li se administrează acelaşi volum de substanță de testat sau vehicul. Animalele din grupul martor se manipulează în acelaşi fel ca animalele din grupul de tratament. Animalelor din grupurile martor tratate doar cu vehiculul li se administrează cea mai mare cantitate de vehicul utilizată (la fel ca în grupul de tratament căruia i se administrează doza cea mai mică).

▼B

1.6.4. **Testul-limită**

Dacă un test cu o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi administrată oral, utilizând procedurile descrise pentru prezentul studiu, nu produce efecte toxice observabile la animalele gestante sau descendenții acestora și dacă, pe baza datelor existente (de exemplu, date privind compuși înrudiți structural și/sau metabolic) nu se prevede niciun efect, este posibil să nu fie necesar un studiu complet cu trei niveluri ale dozei. Expunerea umană prevăzută poate indica necesitatea utilizării unui nivel mai ridicat al dozei administrate oral în testul-limită. Pentru alte căi de administrare, precum inhalarea sau aplicarea cutanată, proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat pot indica și limita, deseori, nivelul maxim de expunere care poate fi atins (de exemplu, aplicarea cutanată nu trebuie să cauzeze o toxicitate locală ridicată).

1.6.5. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat sau vehiculul se administrează, de obicei, oral, prin intubare. În cazul în care se utilizează o altă cale de administrare, examinatorul trebuie să își justifice și să își motiveze alegerea și pot fi necesare modificări adecvate (2) (3) (4). Substanța de testat se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi.

Doza pentru animalele individuale se calculează, în mod normal, în funcție de greutatea corporală a animalului la cea mai recentă cântărire. Cu toate acestea, în ultimul trimestru al gestației, doza se calculează cu prudență. Se utilizează datele existente privind selectarea dozei, pentru a preveni o toxicitate excesivă asupra mamei. Cu toate acestea, dacă se observă o toxicitate excesivă la femelele gestante, animalele în cauză sunt eutanasiate. Dacă mai multe animale gestante prezintă semne de toxicitate excesivă, se ia în considerare sacrificarea grupului tratat cu doza respectivă. Dacă se recurge la gavaj, substanța se administrează, de preferință, într-o singură doză animalelor, printr-o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Dacă vehiculul utilizat este uleiul de porumb, volumul nu trebuie să depășească 0,4 ml/100 g greutate corporală. Se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin modificarea concentrațiilor, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor.

1.6.6. **Observarea femelelor gestante**

Observațiile clinice se efectuează și se înregistrează cel puțin o dată pe zi, de preferință în același moment (aceleași momente) ale zilei, ținând seama de perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozei. Se înregistrează starea animalelor, inclusiv decesul, agonia, modificările comportamentale relevante și toate semnele de toxicitate evidentă.

1.6.7. **Greutatea corporală și consumul de hrană**

Animalele se cântăresc în ziua 0 de gestație sau nu mai târziu de ziua 3 de gestație, dacă animalele împerecheate anterior sunt furnizate de către un crescător exterior, în prima zi a tratamentului, cel puțin o dată la trei zile în perioada tratamentului și în ziua planificată pentru sacrificare.

▼B

Consumul de hrană se înregistrează o dată la trei zile, în zilele în care se cântăresc animalele.

1.6.8. **Examinarea *post-mortem***

Femelele se sacrifică cu o zi înainte de ziua prevăzută pentru fătare. Femelele care manifestă semne de avort sau fătare prematură înainte de ziua planificată pentru sacrificare sunt sacrificate și supuse unui examen macroscopic complet.

În momentul sacrificării sau al decesului în cursul studiului, femela este examinată macroscopic pentru determinarea oricăror anomalii structurale sau modificări patologice. Evaluarea femelelor în cursul cezarienei și analizele ulterioare asupra fetusului se efectuează, de preferință, fără să se cunoască grupul de tratament, pentru a se asigura un nivel maxim de imparțialitate.

1.6.9. **Examinarea conținutului uterin**

Imediat după sacrificare sau imediat ce este posibil după deces, se îndepărtează uterul și se confirmă statutul de gestație al animalelor. Uterele care nu par gestante sunt supuse unui examen suplimentar (de exemplu, prin colorare cu sulfură de amoniu la rozătoare și prin colorare Salewski sau o metodă alternativă adecvată la iepuri) pentru confirmarea absenței gestației (5).

Uterele gestante, inclusiv cervixul, se cântăresc. Nu se cântăresc uterele gestante ale animalelor care au fost găsite moarte în cursul studiului.

La animalele gestante se determină numărul de corpuri galbene.

Conținutul uterin se examinează pentru a determina numărul de embrioni sau fetuși decedați și numărul de fetuși viabili. Se descrie gradul de resorbție pentru a estima momentul relativ al decesului produsului de concepție (a se vedea punctul 1.2).

1.6.10. **Examinarea fetușilor**

Se determină sexul și greutatea fiecărui fetus.

Se examinează fiecare fetus pentru determinarea modificărilor externe (6).

Se examinează fetușii pentru determinarea modificărilor scheletului și ale țesuturilor moi (de exemplu, variații și malformații sau anomalii) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Este de preferat, dar nu obligatoriu, ca modificările fetale să fie înregistrate pe categorii. Dacă se stabilesc categorii, se precizează clar criteriile pentru definirea fiecărei categorii. Se examinează cu o atenție specială tractul genital pentru a se stabili dacă prezintă modificări în dezvoltare.

La rozătoare, circa jumătate din fiecare cuib se pregătește și se examinează pentru modificări ale scheletului. Restul se pregătește și se examinează pentru modificări ale țesuturilor moi, utilizând metode de secționare serială acceptate sau adecvate sau procedând cu atenție la disecția macroscopică.

▼B

La nerozătoare, de exemplu la iepuri, se examinează toți fetușii atât pentru modificări ale țesuturilor moi, cât și pentru modificări ale scheletului. Corpul fetușilor se evaluează prin disecție atentă pentru modificări ale țesuturilor moi, putând fi utilizate inclusiv proceduri pentru evaluarea structurii cardiace interne (25). Capetele a jumătate din fetușii examinați astfel sunt prelevate și prelucrate pentru evaluarea modificărilor țesuturilor moi (inclusiv ochi, creier, pasaje nazale și limbă), utilizând metode de secționare serială (26) sau o altă metodă la fel de sensibilă. Corpurile acestor fetuși și ceilalți fetuși intacți se prelucrează și se examinează pentru modificări ale scheletului, utilizând metodele descrise pentru rozătoare.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele se prezintă individual atât pentru femelele gestante, precum și pentru descendenții acestora și sub forma unui rezumat tabelar care include, pentru fiecare grup de tratament și fiecare generație, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte sau eutanasiate, momentul decesului sau al eutanasierii, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și severitatea efectelor toxice, tipurile de observații asupra embrionilor/fetușilor și toate datele relevante privind cuiburile.

Rezultatele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată, utilizând cuibul ca unitate pentru analiza datelor. Se utilizează o metodă statistică general acceptată; metodele statistice se selectează în etapa de concepere a studiului și se justifică. Se includ și datele privind animalele care nu supraviețuiesc până în ziua planificată pentru sacrificare. Datele în cauză pot fi incluse în mediile grupurilor, dacă sunt relevante. Relevanța datelor obținute de la aceste animale și, prin urmare, includerea sau excluderea lor din media (mediile) grupurilor se justifică și se analizează de la caz la caz.

2.2. EVALUAREA REZULTATELOR

Rezultatele studiului de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine se evaluează din punctul de vedere al efectelor observate. Evaluarea include următoarele observații:

— rezultatele testelor asupra mamelor și embrionilor/fetușilor, inclusiv evaluarea relației sau a absenței unei relații între expunerea animalelor la substanța de testat și incidența și gravitatea tuturor efectelor observate;

— criteriile utilizate pentru stabilirea unor categorii de modificări externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului la fetuși, dacă s-au stabilit astfel de categorii;

▼B

— dacă este cazul, date istorice de control, pentru o mai bună interpretare a rezultatelor studiului;

— numerele utilizate pentru calcularea tuturor procentajelor și indicilor;

— o analiză statistică adecvată a rezultatelor studiului, dacă este cazul, inclusiv informații suficiente privind metoda de analiză pentru ca un revizor/statistician independent să poate reevalua și reface analiza.

În cazul unui studiu care demonstrează absența oricăror efecte toxice, se are în vedere efectuarea unor investigații suplimentare pentru a stabili absorbția și biodisponibilitatea substanței de testat.

2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Un studiu de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine furnizează informații privind efectele expunerii repetate la o substanță în timpul gestației asupra femelelor gestante și asupra dezvoltării intrauterine a descendenților lor. Rezultatele studiului se interpretează în strânsă legătură cu rezultatele altor studii de toxicitate subcronică, de toxicitate asupra reproducerii, toxicocinetice și altele. Întrucât accentul se pune pe toxicitatea generală, prin toxicitatea asupra mamei, și pe toxicitatea asupra dezvoltării intrauterine, rezultatele studiului permit, într-o anumită măsură, să se facă diferența între efectele asupra dezvoltării în absența toxicității generale și cele care sunt induse doar la nivelul care este, de asemenea, toxic pentru animalul gestant (27).

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare include următoarele informații specifice.

Substanța de testat:

— natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;

— identificare, inclusiv numărul CAS, dacă este cunoscut/stabilit;

— puritate.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificare pentru alegerea vehiculului, dacă acesta este diferit de apă.

Animalele de experiență:

— specie și sușă utilizate;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursă, condiții de adăpostire, hrănire etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

— motivația pentru nivelurile dozelor alese;

— detalii privind formula/includerea în hrană a substanței de testat, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

▼B

— detalii privind administrarea substanței de testat;

— transformarea concentrației de substanță de testat în hrană/apa potabilă (ppm) în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— condiții ambientale;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

Rezultate:

Date privind reacție toxică a femelelor gestante, în funcție de doză, inclusiv, fără a se limita la:

— numărul de animale la începutul testului, numărul de animale supraviețuitoare, numărul de animale gestante și care au avortat, numărul de animale care au fătat prematur;

— ziua decesului în cursul studiului sau dacă animalele au supraviețuit până la sacrificare;

— datele privind animalele care nu supraviețuiesc până în ziua planificată pentru sacrificare se precizează, dar nu se includ în comparațiile statistice între grupuri;

— ziua observării oricărui semn clinic anormal și evoluția sa ulterioară;

— greutatea corporală, variațiile acesteia și greutatea uterului gestant, inclusiv, opțional, variațiile de greutate corporală corectate în funcție de greutatea uterului gestant;

— consumul de hrană și, dacă se măsoară, consumul de apă;

— concluziile autopsiei, inclusiv greutatea uterului;

— se raportează valorile NOAEL pentru efecte asupra femelei gestante și asupra dezvoltării.

Puncte finale pentru dezvoltare în funcție de doză pentru cuiburi cu implantări, inclusiv:

— numărul de corpuri galbene;

— numărul de implantări, numărul și procentajul de fetuși vii și decedați și de resorbții;

— numărul și procentajul de pierderi înainte și după implantare.

Puncte finale pentru dezvoltare în funcție de doză, pentru cuiburile cu fetuși vii, inclusiv:

— numărul și procentajul de descendenți vii;

— raportul între cele două sexe;

— greutatea corporală a fetușilor, de preferință defalcat pe sexe și pentru ambele sexe;

— malformații externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului și alte modificări relevante;

— criterii pentru includerea în diverse categorii, dacă este cazul;

▼B

— numărul total și procentajul de fetuși și cuiburi cu modificări externe, ale țesuturilor moi și ale scheletului, precum și tipurile și incidențele diverselor anomalii, precum și alte modificări relevante.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Kavlock R. J. *et al*. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

2. Kimmel, C. A. and Francis, E. Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicology 14; 386-398.

3. Wong, B. A., *et al.* (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CUT Activities 17; 1-8.

4. US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350; Inhalation Developmental Toxicity Study.

5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie 247:367.

6. Edwards, J. A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7. Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congenital Anomalies 16; 171-173.

8. Igarashi, E. *et al*. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32; 381-391.

9. Kimmel, C. A. *et al.* (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47; 229-242.

10. Marr, M. C. *et al.* (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

11. Barrow, M. V. and Taylor, W. J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127; 291-306.

12. Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

13. Gibson, J.P. *et al.* (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9;:398-408.

14. Kimmel, C. A. and Wilson, J. G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8; 309-316.

15. Marr, M. C. *et al.* (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46; 169-181.

▼B

16. Monie, I. W. *et al.* (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.

17. Spark, C. and Dawson, A. B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy 41; 411-445.

18. Staples, R. E. and Schnell, V. L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Stain Technology 39; 61-63.

19. Strong, R. M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy 36; 313-355.

20. Stuckhardt, J. L. and Poppe, S. M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teralogenesis, Carcinogenesis, and Mulagenesis 4; 181-188.

21. Walker, D. G. and Wirtschafter, Z. T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.

22. Wilson, J. G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J. G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 251-277.

23. Wilson, J. G. and Fraser, F. C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

24. Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28; 233-239.

25. Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 37-38.

26. Van Julsingha, E. B. and C. G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

27. US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register 56; 63798-63826.

28. Wise, D. L. *et al.* (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

B.32. STUDII DE CARCINOGENITATE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 451 (2009) a OCDE. Orientarea originală 451 privind carcinogenitatea a fost adoptată în 1981. S-a considerat necesară elaborarea acestei metode de testare revizuite B.32 pentru a reflecta evoluțiile recente în domeniul bunăstării animalelor și cerințelor de reglementare (2) (3) (4) (5) (6). Actualizarea acestei metode de testare B.32 s-a realizat în paralel cu revizuirea capitolului B.30 din prezenta anexă, „Studii de toxicitate cronică”, și capitolului B.33 din prezenta anexă, „Studii combinate de toxicitate cronică și carcinogenitate”, cu obiectivul de a obține informații suplimentare de la animalele folosite în studiu și furnizând detalii suplimentare privind alegerea dozelor. Această metodă testare B.32 este concepută pentru a fi utilizată la testarea unei game largi de substanțe, inclusiv pesticide și produse chimice industriale. Trebuie reținut însă faptul că unele detalii și cerințe pot fi diferite pentru produsele farmaceutice [a se vedea documentul „International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals”].

2. Majoritatea studiilor de carcinogenitate sunt efectuate pe specii de rozătoare, prin urmare, această metodă de testare este destinată în primul rând studiilor efectuate pe aceste specii. În cazul în care sunt necesare studii pe specii de nerozătoare, se aplică principiile subliniate în această metodă de testare și cele din capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6), cu modificările corespunzătoare. Orientări suplimentare sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (7).

3. Cele trei căi de administrare principale folosite în studiile de carcinogenitate sunt orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței testate și de calea de expunere probabilă în cazul omului. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).

4. Această metodă de testare se axează pe expunerea prin intermediul căii orale, calea cea mai folosită în cadrul studiilor de carcinogenitate. Pentru evaluarea riscului pentru sănătatea umană pot fi necesare și studii de carcinogenitate implicând căi de expunere cutanată sau prin inhalare și/sau acestea pot fi necesare în cadrul anumitor regimuri de reglementare, dar aceste două căi de expunere implică o complexitate tehnică considerabilă. Asemenea studii trebuie concepute de la caz la caz, deși metoda de testare prezentată aici pentru evaluarea carcinogenității la administrare orală poate constitui baza unui protocol pentru studiile de inhalare și/sau cutanate, în legătură cu recomandările pentru perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc. Sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (7) și pe cale cutanată (7) (8). Capitolul B.8 din prezenta anexă (9) și capitolul B.29 din prezenta anexă (10), împreună cu Ghidul OCDE privind testarea toxicității acute prin inhalare (8) trebuie consultate în mod special la conceperea unor studii mai lungi implicând expunerea prin inhalare. Capitolul B.9 din prezenta anexă (11) trebuie consultat în cazul testării expunerii prin intermediul căii cutanate.

▼**M4**

5. Studiul de carcinogenitate furnizează informații despre posibilele pericole pentru sănătate care pot fi antrenate de expunerea repetată pe o parte considerabilă a perioadei de viață a speciei utilizate. Studiul va furniza informații privind efectele toxice ale substanței testate, inclusiv potențiala carcinogenitate și poate indica organele-țintă și posibilitatea de acumulare. El poate furniza, de asemenea, o estimare a nivelului efectelor toxice la care nu se observă efecte adverse, iar în cazul agenților carcinogeni fără efect genotoxic, a nivelului răspunsurilor tumorale, informație care poate fi folosită la stabilirea criteriilor pentru expunere umană. Se subliniază, de asemenea, necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații posibil.

6. Obiectivele studiilor de carcinogenitate acoperite de această metodă de testare includ:

— identificarea proprietăților carcinogene ale unei substanțe chimice testate, conducând la o incidență crescută a neoplasmelor, o proporție crescută a neoplasmelor maligne sau a reducerii timpului de apariție a neoplasmelor comparativ cu grupurile martor studiate în paralel;

— identificarea organului (organelor) țintă pentru carcinogenitate;

— identificarea timpului până la apariția neoplasmelor;

— caracterizarea relației doză-răspuns a tumorii;

— identificarea unui nivel la care nu se observă niciun efect advers (NOAEL) sau a punctului de pornire pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);

— extrapolarea efectelor cancerigene la niveluri de expunere umană cu doză redusă;

— furnizarea de date pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. În evaluarea carcinogenității potențiale a unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată, înainte de efectuarea testului, pentru un protocol mai eficient al testului privind potențialul cancerigen și pentru minimizarea utilizării animalelor. Informațiile și considerațiile privind modul de acțiune al unui prezumtiv agent carcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) sunt deosebit de importante, deoarece protocolul optim poate diferi în funcție de tipul substanței chimice testate, respectiv agent carcinogen genotoxic cunoscut sau prezumtiv. Orientări suplimentare asupra considerațiilor privind modul de acțiune se pot găsi în Ghidul nr. 116 (7).

8. Informațiile care pot contribui la protocolul studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimie ale substanței chimice testate; rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, inclusiv teste de genotoxicitate; utilizare (utilizări) anticipată (anticipate) și potențialul de expunere umană; date (Q)SAR disponibile, date de mutagenicitate/genotoxicitate, carcinogenitate și alte date toxicologice privind substanțe cu structură apropiată; date toxicocinetice disponibile (cinetica pentru doză unică și doză repetată, acolo unde sunt disponibile) și date

▼M4

rezultate din studii de expunere repetată. Evaluarea carcinogenității se efectuează doar după ce s-au obținut informațiile inițiale privind toxicitatea din testele de toxicitate la doză repetată de 28 de zile și/sau 90 de zile. Testele de inițiere-promovare a cancerului pe termen scurt pot furniza, de asemenea, informații utile. Se ia în considerare o abordare de testare pe etape a carcinogenității, ca parte a evaluării generale a potențialelor efecte adverse asupra sănătății a unei anumite substanțe chimice testate (16) (17) (18) (19).

9. Metodele statistice cele mai adecvate pentru analiza rezultatelor, protocolul experimentului și obiective se stabilesc înainte de începerea studiului. Aspectele care trebuie luate în considerare sunt, de exemplu, necesitatea ca statisticile să includă ajustarea pentru supraviețuire, analiza riscurilor cumulate privind tumorile relativ la durata de supraviețuire, stabilitatea timpului până la apariția tumorii și analiza în cazul încheierii anticipate pentru unul sau mai multe grupuri. În Ghidul nr. 116 (7) și în Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (20) sunt prezentate orientări privind analizele statistice corespunzătoare și referințe de bază la metode statistice acceptate la nivel internațional.

10. La efectuarea unui studiu de carcinogenitate trebuie să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile din Ghidul OCDE nr. 19 privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (21), în special punctul 62 al documentului. Acest punct stipulează că „*În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, rezultând în deteriorarea în continuare a stării, se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia include considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, se crește frecvența observărilor, după cum este necesar. Poate fi de asemenea posibil, fără a afecta negativ scopul testului, să se întrerupă temporar dozarea sau să se reducă doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința.*”

11. În Ghidul nr. 116 (7), precum și în două publicații ale International Life Sciences Institute (22) (23) se pot găsi orientări detaliate privind principiile de selectare a dozei pentru studii de toxicitate cronică și carcinogenitate și discuții pe această temă. Strategia de selectare a dozei de bază depinde de obiectivul principal sau obiectivele studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor de dozare adecvate trebuie să se atingă un echilibru între depistarea pericolelor, pe de-o parte, și caracterizarea răspunsurilor la doză redusă și relevanța lor, pe de altă parte. Acest lucru este relevant în special în cazul în care se efectuează un studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) (punctul 12).

12. Trebuie să se aibă în vedere efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) în locul efectuării separate a unui studiu de toxicitate cronică (capitolul B.30 din această metodă de testare) și a unui studiu de carcinogenitate (această metodă de testare, B.32). Testul combinat oferă o eficiență mai mare din punct de vedere al timpului și costului, comparativ cu efectuarea a două studii separate, fără a compromite calitatea datelor din faza de toxicitate cronică sau de carcinogenitate. Cu toate acestea, trebuie acordată multă atenție principiilor selectării dozei (punctele 11 și 22-25) la efectuarea unui studiu combinat de toxicitate și carcinogenitate (capitolul B.33 din prezenta anexă) și se recunoaște, de asemenea, că pot fi necesare studii separate în anumite cadre de reglementare.

▼M4

13. Definițiile folosite în contextul acestei metode de testare sunt prezentate la sfârșitul acestui capitol și în Ghidul nr. 116 (7).

PRINCIPIUL TESTULUI

14. Substanța chimică testată se administrează zilnic, de obicei pe cale orală, în doze graduale, câtorva grupuri de animale testate, pe cea mai mare parte din durata lor de viață. Poate fi adecvată și testarea pentru căile de expunere prin inhalare sau cutanată. Animalele sunt examinate atent în legătură cu prezența semnelor de toxicitate și cu apariția leziunilor neoplazice. Animalele care mor sau care sunt sacrificate în cursul testului trebuie să fie supuse unei autopsii, iar la încheierea testului se eutanasiază și se autopsiază animalele care au supraviețuit.

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

15. Această metodă de testare acoperă, în principal, evaluarea carcinogenității la rozătoare (punctul 2). Utilizarea unor specii de nerozătoare poate fi luată în considerare în cazul în care datele disponibile sugerează că acestea sunt mai relevante pentru estimarea efectelor asupra sănătății la om. Alegerea speciei trebuie să fie justificată. Specia de rozătoare preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu șoarecele. Deși utilizarea șoarecilor în testele de carcinogenitate poate avea o utilitate limitată (24) (25) (26), în cadrul unor programe de reglementare curente se impune testarea carcinogenității pe șoareci, în afară de cazul în care se determină faptul că asemenea studiu nu este necesar din punct de vedere științific. Șobolanii și șoarecii au fost modelele experimentale preferate din cauza duratei lor de viață relativ scurte, utilizării lor pe scară largă în studii de farmacologie în toxicologie, receptivității lor privind inducerea tumorilor și disponibilității unor sușe cu un nivel suficient de caracterizare. Ca o consecință a acestor caracteristici, este disponibil un volum mare de informații privind fiziologia și patologia lor. Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).

16. Se utilizează animale adulte, tinere, sănătoase, provenind din sușele folosite în mod obișnuit în laboratoare. Studiul carcinogenității se efectuează, de preferință, pe animale din aceeași sușă și sursă cu cele folosite în studiul (studiile) de toxicitate preliminare de durată mai scrută dar, în cazul în care se știe că animalele din această sușă și sursă prezintă probleme în atingerea criteriilor de supraviețuire acceptate în mod normal pentru studiile pe termen lung [a se vedea Ghidul nr. 116 (7)], se ia în considerare utilizarea unei sușe de animale care au o rată de supraviețuire acceptabilă pentru studiul pe termen lung. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie gestante.

Adăpostire și hrănire

17. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; se ia în considerare adăpostirea individuală a animalelor doar dacă există o justificare științifică (27) (28) (29). Cuștile sunt aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Temperatura camerei în care se află animalele utilizate în scop experimental este de 22 °C (± 3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul este artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Regimul alimentar trebuie să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei testate

▼M4

iar conținutul de contaminanți alimentari care ar putea influența rezultatul testului, incluzând reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fito-estrogeni, metale grele și micotoxine, dar fără limitare la acestea, trebuie să fie cât mai redus posibil. Informațiile analitice privind nutrienții și nivelurile de contaminanți din regimul alimentar se generează periodic, cel puțin la începutul studiului și atunci când există o modificare a grupului folosit și se includ în raportul final. În mod similar, se furnizează informații analitice privind apa potabilă folosită în cadrul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată a substanței testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor, în cazul administrării substanței testate prin alimentație.

Pregătirea animalelor

18. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. În cazul rozătoarelor, administrarea începe cât mai curând posibil după înțărcare și aclimatizare și, preferabil, înainte de vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele testate se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, variațiile în greutate între animalele utilizate pentru fiecare sex trebuie să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a tuturor animalelor în cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele se repartizează aleator în grupurile tratate și grupurile martor. După randomizare, nu trebuie să existe diferențe semnificative între greutățile corporale medii ale grupurilor din cadrul fiecărui sex. În cazul în care există diferențe semnificative din punct de vedere statistic, se repetă etapa de randomizare, dacă este posibil. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare și este marcat permanent cu acest număr prin tatuare, implantare de microcip sau altă metodă adecvată.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

19. Se folosesc ambele sexe. Se folosește un număr suficient de animale, astfel încât să fie posibilă o evaluare biologică și statistică temeinică. Prin urmare, fiecare grup de dozare și grup martor paralel trebuie să conțină minimum 50 de animale de același sex. În funcție de scopul studiului, poate fi posibil să se crească puterea statistică a estimărilor de bază, prin alocarea diferențiată a animalelor în mod inegal la diferitele grupuri de doze, cu mai mult de 50 de animale în grupurile cu doze mici; de exemplu, pentru a estima potențialul cancerigen la doze mici. Cu toate acestea, trebuie recunoscut faptul că o creștere moderată a dimensiunii grupului va produce o creștere redusă a puterii statistice a studiului. Informații suplimentare privind protocolul statistic al studiului și alegerea nivelului de dozare pentru maximizarea puterii statistice sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7).

Sacrificări pe parcurs și grupuri satelit (santinelă)

20. Studiul poate prevedea sacrificări pe parcurs, de exemplu la 12 luni, pentru a asigura informații privind evoluția modificărilor neoplazice și informații mecaniciste, dacă există justificare științifică. În cazul în care asemenea informații sunt deja disponibile din studii anterioare de toxicitate la doză repetată asupra substanței testate, este posibil ca sacrificările pe parcurs să nu fie justificate din punct de vedere științific. În cazul în care sacrificările pe parcurs sunt incluse în protocolul studiului, numărul de animale din fiecare grup de dozare programat pentru sacrificare pe parcurs va fi, de obicei, de 10 animale din fiecare sex, iar numărul total de animale incluse în concepția studiului trebuie să se suplimenteze cu numărul de animale programate să fie sacrificate înainte de încheierea studiului. Se poate include, de asemenea, un grup suplimentar de animale santinelă (de obicei 5 animale din fiecare sex) pentru monitorizarea stării de boală în timpul studiului, dacă este necesar (30). Orientări suplimentare sunt prezentate în Ghidul nr. 116 (7).

▼M4

Grupuri de doze și dozare

21. În Ghidul nr. 116 (7) sunt furnizate orientări privind toate aspectele în legătură cu selectarea dozelor și intervalele dintre nivelurile de dozare. Se utilizează cel puțin trei doze diferite și un grup martor paralel. Nivelul dozelor este stabilit în general în funcție de rezultatele studiilor pe termen mai scurt cu doză repetată sau ale studiilor de stabilire a intervalului și iau în considerare orice date toxicologice și toxico-cinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțe înrudite.

22. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, nivelul cu doza cea mai mare se alege astfel încât să se identifice principalele organe țintă și efectele toxice, fără să se inducă suferințe, toxicitate severă, morbiditate sau moartea. Luând în considerare factorii prezentați la punctul 23 de mai jos, se alege nivelul de cea mai mare doză pentru a produce dovezi de toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %). Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), se poate alege o doză maximă mai mică decât doza care furnizează dovada toxicității, de exemplu, în cazul în care o doză provoacă un efect advers îngrijorător care are totuși un efect redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale.

23. Nivelurile dozelor și intervalul dintre nivelurile de dozare se pot alege astfel încât să se stabilească o reacție doză-răspuns și, în funcție de substanța chimică testată, un NOAEL sau un rezultat intenționat al studiului, de exemplu o BMD (a se vedea punctul 25) la nivelul dozei minime. Printre factorii care trebuie luați în considerare la stabilirea dozelor inferioare se includ panta anticipată a curbei doză-răspuns, dozele la care se pot produce modificări importante în metabolism sau în modul de acțiune toxică, nivelul la care se anticipează un prag sau nivelul la care este anticipat punctul de pornire pentru extrapolarea la doză redusă.

24. Intervalele dintre nivelurile de dozare vor depinde de caracteristicile substanței chimice testate și nu pot fi prescrise în această metodă de testare, dar o performanță bună a testului se obține în mod frecvent cu un factor de 2 până la 4 la formarea seriei descrescătoare a dozelor, iar adăugarea unui al patrulea grup de probă este adesea preferabilă folosirii unor intervale cu factori foarte mari (de exemplu, mai mari de 6-10) între doze. În general se evită utilizarea unor factori peste 10 și, în cazul în care sunt utilizați, trebuie să se prezinte justificarea.

25. Așa cum se arată în Ghidul nr. 116 (7), aspectele care sunt luate în considerare la selectarea dozei includ:

— neliniarități sau puncte de inflexiune cunoscute sau prezumptive în relația doză-răspuns;

— aspecte toxicocinetice și intervale ale dozelor în care intervin sau nu intervin inducția metabolică, saturația sau neliniaritatea între dozele externe și interne;

— leziuni precursoare, markere de efect sau indicatori ai acțiunii unor procese biologice de bază;

— aspecte de bază (sau prezumtive) ale modului de acțiune, de exemplu doze la care începe să apară citotoxicitatea, la care sunt perturbate nivelurile hormonale, sunt excedate mecanismele homeostazice etc.;

▼M4

— regiunile curbei doză-răspuns unde este necesară o estimare deosebit de precisă, de exemplu în domeniul BMD anticipate sau al unui prag anticipat;

— considerații privind nivelurile de expunere umană anticipate.

26. Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței testate se utilizează un vehicul. Cu excepția administrării substanței chimice testate, animalele din grupul martor sunt tratate în mod identic cu acelea din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum de vehicul utilizat pentru grupurile de dozare. Dacă substanța chimică testată se administrează în hrană și determină diminuarea semnificativă a consumului de hrană din savorii reduse, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel.

Pregătirea dozelor și administrarea substanței chimice testate

27. Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, prin alimente ori prin apa potabilă, sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7). Calea și metoda de administrare depind de scopul studiului, de caracteristicile fizice și chimice ale substanței testate, de biodisponibilitatea sa și de calea și metoda de expunere predominante în cazul omului. Trebuie să se prezinte justificarea pentru calea și metoda de administrare alese. Din rațiuni care țin de bunăstarea animalelor, gavajul oral se alege, de obicei, doar pentru acei agenți la care această cale și metodă de administrare reprezintă în mod rezonabil expunerea umană (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțe din hrană sau mediu, inclusiv pesticide, administrarea se face de obicei prin intermediul regimului alimentar sau al apei potabile. Cu toate acestea, pentru unele scenarii, de exemplu expunerea ocupațională, pot fi mai adecvate alte căi de expunere.

28. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă sau se aduce în formă de suspensie într-un vehicul adecvat. Trebuie luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței testate, care i-ar putea afecta caracteristicile toxice; efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Trebuie să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței testate și omogenitatea soluțiilor sau regimurilor alimentare (după caz) în condițiile administrării (de exemplu, prin hrană).

29. În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile, este important să se asigure că bilanțul nutrițional sau hidric normal nu este afectat de cantitatea de substanță chimică testată utilizată. În studiile de toxicitate pe termen lung folosind administrarea prin hrană, concentrația substanței testate în hrană nu trebuie să depășească, de regulă, o limită superioară de 5 % din totalul regimului alimentar, pentru a evita dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată este administrată în hrană, se poate folosi fie o concentrație constantă în hrană (mg/kg alimente sau ppm), fie o doză de nivel constant în raport cu greutatea animalului (mg/kg greutate corporală), calculată săptămânal. Trebuie să se precizeze alternativa utilizată.

▼M4

30. În cazul administrării orale, animalele primesc zilnic doza de substanță chimică testată (șapte zile pe săptămână), de obicei pe o perioadă de 24 de luni pentru rozătoare (a se vedea și punctul 32). Orice alt regim de dozare, de exemplu cinci zile pe săptămână, trebuie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt tratate de obicei cu substanța chimică testată timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, așa cum se specifică în capitolul B.9 din prezenta anexă (11), pe o perioadă de 24 de luni. Expunerea prin inhalare se face timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar se poate folosi și expunerea timp de 5 zile pe săptămână, dacă este justificată. Expunerea va fi de obicei pe o perioadă de 24 de luni. În cazul în care sunt expuse alte specii de rozătoare decât șobolanii doar în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi ajustate pentru minimizarea suferinței specifice speciei. În cazul în care durata expunerii este sub 6 ore pe zi, se prezintă o justificare. A se vedea și capitolul B.8 din prezenta anexă (9).

31. Când substanța chimică testată se administrează prin gavaj, ea se administrează animalelor folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la momente apropiate în fiecare zi. De obicei se administrează o doză unică, o dată pe zi; în cazul în care, de exemplu, o substanță are efect iritant local, rata dozei zilnice poate fi menținută prin administrare ca doză fracționată (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o singură dată depinde de greutatea animalului testat. Volumul se menține cât mai redus posibil și de obicei nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală pentru rozătoare (31). Variațiile volumului administrat trebuie reduse la minimum prin modificarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele potențial corozive sau iritante constituie o excepție și trebuie diluate pentru a evita efecte locale grave. Se evită testarea la concentrații la care este probabil să fie corozive pentru tractul gastrointestinal.

Durata studiului

32. De regulă, durata studiului este de 24 de luni pentru rozătoare, reprezentând cea mai mare parte a duratei de viață a animalelor utilizate. Se pot folosi durate mai scurte sau mai lungi, în funcție de durata de viață a sușei și speciei de animale utilizate în studiu, dar acestea trebuie să fie justificate. Pentru sușe specifice de șoareci, de exemplu AKR/J, C3H/J sau C57BL/6J, poate fi mai adecvată o durată de 18 luni. În continuare, se prezintă orientări privind durata studiului, încetarea sa și supraviețuirea; orientări suplimentare, inclusiv considerații privind posibilitatea de acceptare a unei carcinogenități negative în raport cu rata de supraviețuire, sunt prezentate în Ghidul nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (7).

— încheierea studiului trebuie să fie luată în considerare când numărul de supraviețuitori din grupurile cu niveluri reduse de dozare sau din grupurile martor scade sub 25 %;

— în cazul în care doar grupul cu nivel ridicat de dozare moare prematur din cauza toxicității, acest lucru nu determină încheierea studiului;

— supraviețuirea la fiecare sex este luată în considerare separat;

— studiul nu se va extinde dincolo de punctul unde datele disponibile din studiu nu mai sunt suficiente pentru a permite efectuarea unei evaluări valabile din punct de vedere statistic.

▼M4

OBSERVAȚII

33. Toate animalele sunt examinate pentru a constata simptome de morbiditate și mortalitate, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv în zilele de weekend și sărbători. Animalele se examinează în plus o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, pentru simptome specifice cu relevanță toxicologică, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare, în cazul administrării prin gavaj. O atenție deosebită trebuie acordată evoluției tumorilor; se înregistrează momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea atât a tumorilor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile.

Greutatea corporală, consumul de hrană și apă și eficiența hranei

34. Toate animalele se cântăresc la începutul tratamentului, cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Măsurătorile consumului de hrană și ale eficienței hranei se fac cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni și cel puțin o dată pe lună ulterior, în cazul în care substanța chimică testată este administrată în apa potabilă. Măsurătorile consumului de apă se iau în considerare și la studiile în care băutul suferă modificări.

Determinările hematologice, biochimice și de alt tip

35. Pentru maximizarea informațiilor obținute din studiu, în special pentru considerațiile privind modul de acțiune, se recoltează probe de sânge pentru analize hematologice și biochimice, la aprecierea conducătorului studiului. Poate fi indicată și analiza urinei. Orientări suplimentare privind utilitatea recoltării unor asemenea probe ca parte a studiului de carcinogenitate sunt prezentate în Ghidul OCDE nr. 116 (7). Dacă se consideră adecvat, recoltarea de probe de sânge pentru determinările hematologice și analiza urinei se pot efectua ca parte a unei sacrificări pe parcurs (punctul 20) și la încheierea studiului, pe minimum 10 animale din fiecare sex și grup. Probele de sânge sunt prelevate dintr-un punct determinat, de exemplu prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital, sub anestezie, și sunt păstrate, dacă este cazul, în condiții adecvate. Se pot prepara și frotiuri sangvine pentru examinare, în special dacă măduva osoasă pare a fi organul-țintă, deși s-a pus la îndoială valoarea acestei examinări pentru evaluarea potențialului carcinogen/oncogen (32).

PATOLOGIA

Autopsia

36. Toate animalele care participă la studiu, cu excepția animalelor santinelă (a se vedea punctul 20) și altor animale satelit, sunt supuse unei autopsii complete, care să includă o examinare aprofundată a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavității craniene, toracice și abdominale și a conținutului acestora. Animalele santinelă și alte animale satelit pot necesita autopsierea de la caz la caz, la aprecierea conducătorului studiului. În mod obișnuit, greutatea organelor nu face parte dintr-un studiu de carcinogeneză, deoarece modificările geriatrice și, în stadii mai târzii, formarea tumorilor, afectează utilitatea datelor privind greutatea organelor. Ele pot fi însă critice pentru o evaluare bazată pe forța probantă a datelor și, în special, pentru considerații privind modul de acțiune. În cazul în care sunt parte a unui studiu satelit, ele sunt colectate nu mai târziu de un an de la inițierea studiului.

▼M4

37. Următoarele țesuturi se conservă în mediul de fixare cel mai adecvat pentru țesut și pentru examinarea histopatologică ulterioară intenționată (33) (țesuturile trecute între paranteze pătrate sunt opționale):

toate leziunile macroscopice	inimă	pancreas	stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)
glande suprarenale	ileon	glande paratiroide	[dinți]
aortă	jejun	nervi periferici	testicule
creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte)	rinichi	hipofiză	timus
cec	glandele lacrimale (extraorbitale)	prostată	tiroidă
col uterin	ficat	rect	[limbă]
glande coagulante	plămân	glande salivare	trahee
colon	noduli limfatici (superficiali și de profunzime)	veziculă seminală	vezică urinară
duoden	glande mamare (obligatoriu pentru femele și, dacă se pot diseca vizibil, de la masculi)	mușchi scheletici	uter (inclusiv colul uterin)
epididim	[căi respiratorii superioare, inclusiv nasul, cornetele nazale și sinusurile paranazale]	piele	[ureter]
ochi (inclusiv retina)	esofag	măduva spinării (la trei niveluri: cervical, toracic și lombar)	[uretră]
[femur cu articulație]	[bulb olfactiv]	splină	vagin
vezica biliară (pentru alte specii în afară de șobolan)	ovar	[stern],	secțiune de măduvă osoasă și/sau aspirat proaspăt de măduvă
glandă lacrimală			

În cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se conservă ambele organe. Observațiile clinice și de altă natură pot să conducă la necesitatea de a examina țesuturi suplimentare. Se conservă și alte organe considerate probabile organe-țintă, având în vedere proprietățile cunoscute ale substanței testate. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, se păstrează lista organelor specificată pentru calea orală și este esențială prelevarea specifică și conservarea pielii de la locul de aplicare. În studiile de inhalare, lista de țesuturi conservate și examinate din căile respiratorii urmează recomandările capitolelor B.8 și B.29 din prezenta anexă. Pentru alte organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specific din căile respiratorii) se examinează lista organelor specificate pentru calea de administrare orală.

▼M4

Examenul histopatologic

38. Sunt disponibile orientări privind cele mai bune practici în desfășurarea studiilor de patologie toxicologică (33). Țesuturile supuse examinărilor histopatologice includ, cel puțin următoarele:

— toate țesuturile din grupurile tratate cu doza maximă și din grupurile martor;

— toate țesuturile de la animalele care au murit sau au fost sacrificate în cursul studiului;

— toate țesuturile prezentând anomalii macroscopice, inclusiv tumori;

— în cazul în care se observă modificări histopatologice în legătură cu tratamentul în grupul tratat cu doză maximă, acele țesuturi se vor examina la toate animalele din toate celelalte grupuri de dozare;

— în cazul organelor perechi, de exemplu rinichi, glande suprarenale, se examinează ambele organe.

DATE ȘI RAPORT

Date

39. Se furnizează date individuale despre animale pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele trebuie rezumate în formă tabelară, arătându-se pentru fiecare grup testat, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau sacrificate din motive umane și momentul morții sau al sacrificării, numărul de animale prezentând simptome de toxicitate, o descriere a simptomelor de toxicitate, în special momentul apariției acestora, durata și severitatea tuturor efectelor toxice, numărul animalelor prezentând leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor prezentând fiecare tip de leziune. Tabele cu date sumare prezintă mediile și deviațiile standard (pentru date de testare continue) la animalele care prezintă efecte toxice sau leziuni, plus clasificarea leziunilor.

40. Datele istorice de control pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu în cazul în care există indicații că datele furnizate de animale din grupul martor paralel nu sunt în concordanță, într-o măsură substanțială, cu datele recente de la animale din grupul martor din aceeași unitate/colonie de testare. În cazul în care sunt evaluate, datele martor anterioare se transmit de la același laborator și se referă la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă cu cele generate în ultimii cinci ani înaintea studiului în cauză.

41. Dacă este cazul, datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată și general acceptată. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate trebuie să fie selecționate în etapa de concepție a studiului (punctul 9). Selecția ia în considerare ajustări pentru supraviețuire, dacă este necesar.

Raportul de testare

42. Raportul de testare conține următoarele date:

Substanța chimică testată:

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare;

▼**M4**

— sursa substanței;

— numărul lotului;

— certificatul de analiză chimică.

Vehiculul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

Animalele testate:

— specia/sușa folosite și justificarea alegerii făcute;

— numărul, vârsta și sexul animalelor la începutul testării;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condițiile de testare:

— justificarea căii de administrare și a dozelor alese;

— după caz, metodele statistice folosite pentru analiza datelor;

— detalii privind formularea/includerea în hrană a substanței testate;

— date analitice privind concentrația atinsă, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— calea de administrare și detalii privind administrarea substanței testate;

— pentru studiile de inhalare, dacă expunerea a fost în zona nasului sau a întregului corp;

— dozele reale (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a substanței testate din concentrație în hrană sau apa potabilă (mg/kg sau ppm) la doza reală, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele)

Generalități:

— date privind supraviețuirea;

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană, calcule privind eficiența hranei, dacă s-au efectuat, și consumul de apă, dacă este cazul;

— date toxicocinetice (dacă sunt disponibile);

— oftalmoscopie (dacă este disponibilă);

— examen hematologic (dacă este disponibil);

— analize de biochimie (dacă sunt disponibile).

▼**M4**

Concluziile clinice:

— semne de toxicitate;

— incidența (și, dacă a fost evaluată, gravitatea) anomaliilor morfologice;

— natura, gravitatea și durata semnelor clinice (dacă sunt tranzitorii sau permanente).

Datele privind autopsia:

— greutatea corporală finală;

— greutatea organelor și rapoartele lor, dacă este cazul;

— rezultatele autopsiei; incidența și gravitatea anomaliilor.

Examenul histopatologic:

— rezultatele histopatologice non-neoplazice;

— rezultatele histopatologice neoplazice;

— corelația între rezultatele macroscopice și cele microscopice;

— o descriere detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice în legătură cu tratamentul, inclusiv clasificarea gravității;

— raportarea examinării lamelor de către alte echipe.

Interpretarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:

— discutarea tuturor abordărilor privind modelarea;

— relațiile doză-răspuns;

— date istorice de control;

— considerarea tuturor informațiilor privind modul de acțiune;

— determinarea valorilor BMD, NOAEL sau LOAEL;

— relevanța pentru om.

Concluzii.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼**M4**

(6) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Testul de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, disponibil pe site-ul internet public al OCDE referitor la orientările privind testele, la adresa www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 de zile”.

(10) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.

(11) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., and Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill RN., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, Crit Rev. Toxicol., 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (ed.), ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. și Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. În D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds), Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation, Queen's University Press, Belfast, pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K. *et al.* (1996), Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology, Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanța chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

B.33. STUDII COMBINATE DE TOXICITATE CRONICĂ ȘI DE CARCINOGENITATE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 453 (2009) a OCDE. Prima orientare 453 a fost adoptată în 1981. Elaborarea acestei metode de testare B.33 actualizată a fost considerată necesară pentru a reflecta evoluțiile recente din domeniul bunăstării animalelor și ale cerințelor de reglementare (1) (2) (3) (4) (5). Actualizarea acestei metode de testare B.33 s-a realizat simultan cu revizuirea capitolelor B.32 „Studii de carcinogenitate” și B.30 „Studii de toxicitate cronică” din prezenta anexă, în vederea obținerii de informații adiționale de la animalele utilizate în studii și furnizării unor detalii suplimentare privind selectarea dozei. Această metodă de testare este destinată utilizării în testarea unei game largi de substanțe chimice, inclusiv pesticide și substanțe chimice industriale. Cu toate acestea, ar trebui avut în vedere faptul că unele detalii și cerințe pot fi diferite de cele privind produsele farmaceutice [a se vedea *International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*].

2. Majoritatea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate se desfășoară pe specii de rozătoare, această metodă de testare fiind destinată în primul rând studiilor efectuate pe aceste specii. În cazul în care va fi necesară realizarea acestor studii la specii de nerozătoare pot fi aplicate, de asemenea, principiile și procedurile descrise, cu modificările corespunzătoare, împreună cu cele descrise în capitolul B.27 „Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6) din prezenta anexă, astfel cum este descris în Ghidul OCDE nr. 116 privind protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (*Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies*) (7).

3. Cele trei căi de administrare principale utilizate în studiile de toxicitate cronică/carcinogenitate sunt cea orală, cutanată și prin inhalare. Alegerea căii de administrare depinde de caracteristicile fizice și chimice ale substanței chimice testate și de calea de expunere predominantă la om. Informații suplimentare privind alegerea căii de expunere sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).

4. Această metodă de testare vizează expunerea pe cale orală, calea cea mai frecvent utilizată în cadrul studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate. Deși studiile pe termen lung care utilizează expunerea pe cale cutanată sau prin inhalare pot fi, de asemenea, necesare pentru evaluarea riscurilor la adresa sănătății umane și/sau în conformitate cu anumite regimuri de reglementare, ambele căi de expunere presupun o complexitate tehnică deosebită. Aceste studii vor trebui să fie proiectate de la caz la caz și, chiar dacă metoda de testare, astfel cum este prezentată aici, pentru evaluarea toxicității cronice și carcinogenității prin administrare orală ar putea forma baza unui protocol pentru studii privind administrarea pe cale cutanată/prin inhalare în ceea ce privește recomandările privind perioadele de tratament, parametrii clinici și patologici etc., sunt disponibile orientări OCDE privind administrarea substanțelor chimice testate prin inhalare (7) (8) și pe cale cutanată (7). La proiectarea studiilor pe termen lung privind expunerea prin inhalare ar trebui consultate, în mod special, capitolul B.8 (9) și capitolul B.29 (10) din prezenta anexă, împreună cu Ghidul OCDE privind testarea acută prin inhalare (8). Capitolul B.9 din prezenta anexă (11) ar trebui să fie consultat în cazul testelor efectuate pe cale cutanată.

▼M4

5. Studiul combinat de toxicitate cronică/carcinogenitate oferă informații privind posibilele pericole la adresa sănătății care pot apărea ca urmare a expunerii repetate pe o perioadă cel mult egală cu întreaga durată de viață a speciei utilizate. Studiul furnizează informații privind efectele toxice ale substanței chimice testate, inclusiv eventualul potențial cancerigen, indicând organele țintă și posibilitatea de acumulare. Acesta poate oferi și o estimare a nivelului la care nu se observă efecte adverse în ceea ce privește efectele toxice și, în cazul substanțelor cancerigene non-genotoxice, în ceea ce privește răspunsul tumoral, care poate fi utilă la stabilirea criteriilor de securitate în cazul expunerii umană. De asemenea, se pune accentul pe necesitatea observării clinice atente a animalelor, astfel încât să se obțină cât mai multe informații cu putință.

6. Obiectivele studiilor de toxicitate cronică/carcinogenitate incluse în această metodă de testare includ:

— identificarea proprietăților cancerigene ale unei substanțe chimice testate care conduc la o incidență crescută a neoplasmelor, creșterea numărului de neoplasme maligne sau reducerea perioadei de apariție a neoplasmelor comparativ cu grupurile martor;

— identificarea perioadei de apariție a neoplasmelor;

— identificarea toxicității cronice a substanței chimice testate;

— identificarea organului (organelor) țintă ale toxicității cronice și carcinogenității;

— caracterizarea relației doză-răspuns;

— identificarea nivelului dozei fără efect advers vizibil (NOAEL) sau a punctului de plecare pentru stabilirea unei doze de referință (BMD);

— extrapolarea efectelor cancerigene la niveluri ale expunerii umane corespunzătoare unor doze reduse;

— predicția efectelor toxicității cronice la niveluri ale expunerii umane;

— furnizarea de date pentru ipotezele de testare privind modul de acțiune (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Atunci când apreciază și evaluează carcinogenitatea și toxicitatea cronică potențiale ale unei substanțe chimice testate, laboratorul de testare ar trebui să țină cont de toate informațiile disponibile privind substanța chimică testată anterior efectuării studiului, în vederea adaptării acestuia pentru o testare mai eficientă a proprietăților toxicologice ale substanței și pentru a reduce la minimum utilizarea animalelor. Informațiile și analizarea modului de acțiune al unei substanțe suspectate a fi cancerigenă (2) (7) (12) (13) (14) (15) sunt deosebit de importante, deoarece proiectul optim al studiului poate diferi în funcție de caracterul cancerigen genotoxic cunoscut sau suspectat al substanței chimice testate. Orientări suplimentare privind modul de acțiune sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7).

8. Informațiile care vor ajuta la proiectarea studiului includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, orice date referitoare la modul de acțiune, rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, inclusiv teste de genotoxicitate, utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) și potențialul de expunere umană, datele Q(SAR) disponibile, caracterul mutagen/genotoxic, carcinogenitatea și alte date toxicologice referitoare la substanțele chimice înrudite din punct de vedere structural, datele toxicocinetice disponibile (cinetica dozei unice și, de asemenea, a dozei multiple, atunci când este disponibilă) și datele obținute din alte studii de expunere repetată. Determinarea toxicității cronice/carcinogenității ar trebui efectuată numai după obținerea de informații

▼M4

inițiale asupra toxicității din teste de toxicitate cu doză repetată de 28 de zile și/sau de 90 de zile. Informații utile pot fi oferite, de asemenea, de testele de scurtă durată de inițiere-promovare a cancerului. Ar trebui avută în vedere o procedură de testare etapizată a carcinogenității ca parte din evaluarea generală a posibilelor efecte adverse ale unei anumite substanțe chimice testate asupra sănătății (16) (17) (18) (19).

9. Înainte de începerea studiului ar trebui stabilite cele mai adecvate metode statistice pentru analiza rezultatelor, în funcție de proiectul experimental și obiectivele date. Între aspectele care ar trebui avute în vedere se află necesitatea ca statisticile să includă ajustarea în funcție de supraviețuire, analiza riscurilor de tumori cumulative în raport cu durata de supraviețuire, analiza perioadei până la apariția tumorii și analiza în cazul sfârșitului prematur al unuia sau mai multor grupuri. Ghidul nr. 116 (7) și Ghidul nr. 35 privind analiza și evaluarea studiilor de toxicitate cronică și carcinogenitate (20) conțin recomandări privind analizele statistice adecvate, precum și referințe cheie la metode statistice acceptate la nivel internațional.

10. În cursul realizării unui studiu de carcinogenitate ar trebui să se respecte întotdeauna principiile și considerațiile fundamentale conținute în Ghidul OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale din considerente umane pentru animalele utilizate în scop experimental în evaluarea siguranței (21), în special punctul 62. Acest punct prevede: „*În studiile care implică dozarea repetată, în cazul în care un animal prezintă semne clinice progresive, conducând la deteriorarea în continuare a stării, trebuie să se ia o decizie în cunoștință de cauză privind eutanasierea animalului. Decizia trebuie să includă considerații privind valoarea informațiilor care s-ar putea obține din păstrarea în continuare a animalului în studiu, în funcție de starea sa generală. În cazul în care se ia decizia de a menține animalul în cadrul testului, trebuie să crească frecvența observărilor, după cum este necesar. De asemenea, fără a afecta negativ scopul testului, se poate întrerupe temporar dozarea sau se poate reduce doza de testare, dacă astfel se reduce durerea sau suferința*”.

11. Orientări detaliate și o discuție asupra principiilor de selectare a dozelor pentru studiile de toxicitate cronică și carcinogenitate sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7) și în două publicații ale International Life Sciences Institute (22) (23). Strategia de selecție a dozei principale depinde de obiectivul sau obiectivele primare ale studiului (punctul 6). La selectarea nivelurilor dozelor adecvate ar trebui să asigure un echilibru între screening-ul pericolelor, pe de o parte, și caracterizarea reacțiilor la doze reduse și relevanța acestora, pe de altă parte. Acest lucru este necesar în special în cazul studiului combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate de față.

12. Ar trebui avută în vedere efectuarea acestui studiu combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate în locul realizării separate a studiului de toxicitate cronică (capitolul B.30 din prezenta anexă) și a studiului de carcinogenitate (capitolul B.32 din prezenta anexă). Testul combinat asigură o eficiență mai mare din punct de vedere financiar și al duratei și o reducere a numărului de animale comparativ cu realizarea studiilor separate, fără a compromite calitatea datelor obținute în etapa de studiu a cronicității sau a carcinogenității. Cu toate acestea, când se realizează studiul combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate ar trebui să se acorde atenție deosebită principiilor de selecție a dozei (punctele 11 și 22-26), recunoscându-se în același timp că anumite cadre de reglementare pot impune efectuarea separată a unor astfel de studii. Orientări suplimentare pentru obținerea unei eficiențe maxime a studiului combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate în ceea ce privește posibilitățile de reducere a numărului de animale utilizate și simplificarea diferitelor proceduri experimentale sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7).

▼M4

13. Definițiile utilizate în contextul acestei metode de testare sunt disponibile la sfârșitul prezentului capitol și în Ghidul nr. 116 (7).

PRINCIPIUL TESTULUI

14. Proiectul studiului prevede două etape paralele: o etapă privind cronicitatea și o etapă privind carcinogenitatea (pentru duratele acestora, a se vedea punctele 34, respectiv 35). Substanța chimică testată se administrează de obicei oral, dar și administrarea prin inhalare sau pe cale cutanată poate fi adecvată. În etapa privind cronicitatea, substanța chimică testată se administrează zilnic, în doze crescătoare, la mai multe grupuri de animale de test, un nivel al dozei pe grup, fiind administrată în mod normal timp de 12 luni, deși perioadele de administrare pot varia în funcție de cerințele de reglementare (a se vedea punctul 34). Această perioadă ar trebui să fie suficient de lungă pentru a evidenția efectele toxicității cumulative, dar și suficient de scurtă pentru a preveni efectele de confuzie cauzate de modificările legate de îmbătrânire. Proiectul studiului poate include, de asemenea, una sau mai multe sacrificări pe parcurs, de exemplu la 3 și la 6 luni, și pot fi incluse grupuri suplimentare de animale pentru a le înlocui pe cele sacrificate (a se vedea punctul 20). În etapa privind carcinogenitatea, substanța chimică testată este administrată zilnic mai multor grupuri de animale de test, pe o perioadă îndelungată din viața acestora. Animalele sunt observate cu atenție în ambele etape pentru identificarea semnelor de toxicitate și dezvoltarea de leziuni neoplazice. Animalele care au murit sau care au fost sacrificate în cursul testului sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt sacrificate și autopsiate.

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

15. Această metodă de testare se referă în principal la aprecierea și evaluarea toxicității cronice și carcinogenității la rozătoare (punctul 2). Poate fi avută în vedere utilizarea speciilor de nerozătoare atunci când datele disponibile sugerează că acestea oferă date mai relevante pentru anticiparea efectelor asupra sănătății umane. Alegerea speciei ar trebui justificată. Specia de rozătoare preferată este șobolanul, deși pot fi folosite și alte specii de rozătoare, de exemplu, șoarecele. Deși folosirea șoarecilor în testele de carcinogenitate poate avea o utilitate limitată (24) (25) (26), unele programe de reglementare actuale continuă să impună efectuarea testelor de carcinogenitate pe șoareci, cu excepția cazurilor în care este stabilit faptul că un astfel de studiu nu este necesar din punct de vedere științific. Șobolanii și șoarecii au fost preferați ca modele experimentale datorită duratei de viață relativ scurte, utilizării extinse în studii farmacologice și toxicologice, susceptibilității la declanșarea tumorilor și disponibilității de sușe cu un nivel suficient de caracterizare. Ca urmare a acestor caracteristici, există un volum mare de informații disponibile privind fiziologia și patologia acestora. Protocolul și efectuarea studiilor de toxicitate cronică și de carcinogenitate pe specii de nerozătoare ar trebui să se întemeieze, dacă este necesar, pe principiile evidențiate în această metodă de testare și în capitolul B.27 din prezenta anexă, „Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare” (6). Informații suplimentare privind alegerea speciei și sușei sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).

16. Trebuie să se utilizeze animale adulte, tinere, sănătoase provenind din sușe utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Studiul combinat de toxicitate cronică și carcinogenitate trebuie să se desfășoare pe animale provenite din aceeași sușă și sursă ca animalele utilizate în cadrul studiilor preliminare de toxicitate de scurtă durată; cu toate acestea, în cazul în care animalele din această sușă și sursă sunt recunoscute ca având dificultăți de satisfacere a criteriilor acceptate de supraviețuire necesare pentru studiile de lungă durată [a se vedea Ghidul nr. 116 (7)], ar trebui avută în vedere utilizarea unei sușe de animale cu o rată de supraviețuire acceptabilă pentru studiile pe termen lung. Femelele ar trebui să fie nulipare și să nu fie gestante.

▼M4

Condiții de adăpostire și de hrănire

17. Animalele pot fi adăpostite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex; adăpostirea individuală ar trebui avută în vedere numai atunci când se justifică din punct de vedere științific (27) (28) (29). Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Temperatura incintei în care se află animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul, nivelul urmărit ar trebui să fie de 50-60 %. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut. Alimentația ar trebui să satisfacă toate cerințele nutriționale ale speciei supuse testului, iar conținutul contaminanților din alimentație, inclusiv dar fără a se limita la reziduuri de pesticide, poluanți organici persistenți, fitoestrogeni, metale grele și micotoxine, care pot influența rezultatul testului, ar trebui menținut la un nivel cât mai redus. Informațiile analitice privind nivelul nutrienților și al substanțelor contaminante din alimentație ar trebui generate periodic, cel puțin la începutul studiului și în caz de modificare a grupului utilizat, și ar trebui incluse în raportul final. În mod similar, ar trebui furnizate informații analitice privind apa de băut utilizată în cursul studiului. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a se asigura o proporție adecvată a substanței chimice testate și de a satisface cerințele nutriționale ale animalelor în cazul în care substanța chimică testată se administrează prin alimentație.

Pregătirea animalelor

18. Ar trebui utilizate animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 7 zile și care nu au fost supuse anterior altor proceduri experimentale. În cazul rozătoarelor, administrarea ar trebui să înceapă cât mai curând posibil după înțărcare și aclimatizare, preferabil, înainte de a împlini vârsta de 8 săptămâni. Pentru animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui precizată specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele utilizate în scopuri experimentale de ambele sexe ar trebui să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a tuturor animalelor din cadrul studiului, separat pentru fiecare sex. Animalele ar trebui să fie repartizate aleator în grupuri tratate și grupuri martor. După această repartizare aleatorie, greutatea medie a grupurilor de același sex nu mai ar trebui să prezinte diferențe semnificative. Dacă există diferențe importante din punct de vedere statistic, etapa de repartizare aleatorie ar trebui repetată, dacă este posibil. Fiecărui animal ar trebui să i se atribuie un număr unic de identificare, și care să îi fie marcat permanent prin tatuare, implantarea unui microcip sau prin altă metodă adecvată.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

19. Ar trebui utilizate animale de ambele sexe. Ar trebui utilizat un număr suficient de animale pentru a permite o evaluare biologică și statistică amănunțită. Astfel, fiecare grup de rozătoare de doză (conform punctului 22) și grupul martor aferent din etapa de studiu al carcinogenității ar trebui să conțină cel puțin 50 de animale de fiecare sex. În funcție de scopul studiului, puterea statistică a estimărilor principale poate fi majorată prin alocarea diferențiată și neproporțională a animalelor în diferitele grupuri de doză, cu mai mult de 50 de animale repartizate în grupurile cu tratate cu doză redusă, de exemplu, pentru a estima potențialul cancerigen la doze reduse. Cu toate acestea, ar trebui recunoscut faptul că o creștere moderată a dimensiunii grupului va oferi o creștere relativ redusă a puterii statistice a studiului. Atunci când sunt utilizate rozătoare, fiecare grup de doză (conform punctului 22) și grupul martor aferent din etapa de studiu al carcinogenității ar trebui să conțină cel puțin 10 animale de fiecare sex. Ar trebui observat că acest număr este mai mic decât cel utilizat în studiul

▼M4

privind toxicitatea cronică (capitolul B.30 din prezenta anexă). Totuşi, interpretarea datelor provenite de la un număr mai mic de animale pe grup care au fost obținute în etapa de toxicitate cronică a acestui studiu combinat va fi confirmată de datele provenite de la numărul mai mare de animale, obținute în etapa de carcinogenitate a studiului. În studiile care utilizează şoareci, efectuarea tuturor analizelor hematologice poate necesita un număr suplimentar de animale în fiecare grup de doză în etapa de toxicitate cronică. Informații suplimentare privind proiectul statistic al studiului și selectarea nivelurilor dozelor în vederea maximizării puterii statistice sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).

Sacrificări pe parcurs, grupuri satelit și animale santinelă

20. Studiul poate conține prevederi referitoare la sacrificări pe parcurs, de exemplu la 6 luni în etapa de studiu a toxicității cronice, care să ofere informații privind progresul modificărilor non-neoplazice și informații mecaniciste, dacă acestea sunt justificate din punct de vedere științific. Sacrificările pe parcurs pot să nu fie justificate din punct de vedere științific atunci când studiile de toxicitate cu dozare repetată asupra substanței chimice testate conțin deja astfel de informații. Animalele utilizate în etapa de toxicitate cronică a acestuia, de obicei pentru o perioadă de 12 luni (punctul 34), oferă date utile privind sacrificările pe parcurs pentru etapa de carcinogenitate a studiului, permițând astfel reducerea numărului total de animale utilizate. În etapa de toxicitate cronică a studiului pot fi incluse, de asemenea, grupuri satelit pentru monitorizarea reversibilității oricăror modificări toxicologice induse de substanța chimică testată. Acestea pot fi limitate la nivelul cel mai mare al dozei și la grupul martor. Dacă este necesar, în studiu poate fi inclus un grup suplimentar de animale santinelă (de obicei, câte 5 animale de fiecare sex), în scopul monitorizării stadiului bolii (30). Orientări suplimentare privind introducerea în proiectul studiului a sacrificărilor pe parcurs, a animalelor satelit și santinelă, precum și pentru diminuarea numărului de animale utilizate sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7).

21. Dacă în proiectul studiului sunt incluse animale satelit și/sau sacrificări pe parcurs, numărul animalelor din fiecare grup de doză inclus în acest scop va fi, în mod normal, de câte 10 exemplare pentru fiecare sex, iar numărul total de animale incluse în proiectul studiului ar trebui să fie suplimentat cu numărul de animale planificate să fie sacrificate înainte de finalizarea studiului. Animalele sacrificate pe parcurs și animalele satelit ar trebui supuse, în mod normal, acelorași observații și investigații patologice ca și animalele utilizate în etapa privind toxicitatea cronică a studiului principal, inclusiv măsurători ale greutății corporale, consum de hrană/apă, hematologice și de biochimie clinică, deși pot fi prevăzute și dispoziții (în cazul grupurilor care urmează a fi sacrificate în cursul studiului) pentru limitarea măsurătorilor la criterii cheie specifice, precum neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea.

Grupuri de doză și dozare

22. Orientări privind toate aspectele legate de selectarea și intervalul între doze sunt disponibile în Ghidul nr. 116 (7). Ar trebui utilizate cel puțin trei doze diferite și un grup martor paralel, atât în etapa de toxicitate cronică, cât și în cea de carcinogenitate. Nivelurile dozelor se vor stabili, în general, în funcție de rezultatele studiilor pe termen scurt cu doză repetată sau ale studiilor de stabilire a dozei și ar trebui să ia în considerare orice date toxicologice și toxicocinetice disponibile pentru substanța chimică testată sau substanțele chimice înrudite.

▼M4

23. Este posibil ca un studiu integral cu trei doze de niveluri diferite să nu fie considerat necesar în etapa de toxicitate cronică a studiului dacă se poate anticipa că un test cu o doză având un singur nivel, echivalentă cu cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, nu va produce efecte adverse. Această decizie ar trebui să se întemeieze pe informații obținute din studii preliminare și, ținând cont de datele de la substanțele chimice înrudite structural, pe absența probabilă a toxicității. Limita recomandată este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu excepția cazurilor în care expunerea umană indică necesitatea utilizării unui nivel mai mare al dozei.

24. Cu excepția cazului în care există limite impuse de caracterul fizico-chimic sau de efectele biologice ale substanței chimice testate, nivelul cel mai mare al dozei ar trebui ales astfel încât să permită identificarea principalelor organe-țintă și a efectelor toxice, evitând în același timp suferința, toxicitatea severă, morbiditatea sau moartea. În mod normal, nivelul cel mai mare al dozei ar trebui selectat astfel încât să provoace toxicitate, evidențiată, de exemplu, prin diminuarea ritmului de creștere în greutate (aproximativ 10 %). Cu toate acestea, în funcție de obiectivele studiului (a se vedea punctul 6), o doză maximă mai mică decât doza care provoacă toxicitate poate fi selectată dacă, de exemplu, o doză provoacă un efect advers îngrijorător, dar care are un impact redus asupra duratei de viață sau a greutății corporale.

25. Nivelurile dozelor și intervalele între doze pot fi selectate astfel încât să se determine o relație doză-răspuns și, în funcție de modul de acțiune al substanței chimice testate, un NOAEL sau un alt rezultat avut în vedere pentru studiu, de exemplu BMD (doză de referință) (a se vedea punctul 27). Factorii care ar trebui luați în considerare la stabilirea dozelor reduse includ panta preconizată a curbei doză-răspuns, dozele la care pot avea loc modificări importante ale metabolismului sau modului de acțiune toxică și dacă se anticipează un prag sau un punct de pornire pentru extrapolarea dozei reduse. Principalul obiectiv al unui studiu combinat de carcinogenitate/toxicitate cronică va consta în obținerea de informații utilizabile în scopuri de evaluare a riscului de carcinogenitate, iar informațiile privind toxicitatea cronică vor fi, în mod normal, un obiectiv secundar. Acest aspect ar trebui avut în vedere atunci când se stabilesc nivelurile dozelor și intervalele între doze pentru studiu.

26. Intervalul selectat între doze va depinde de obiectivele studiului și de caracteristicile substanței chimice testate și nu poate fi stabilit în detaliu în această metodă de testare, dar intervale ce corespund unui factor de 2 până la 4 oferă în mod frecvent performanțe de testare bune în determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor și este deseori de preferat să fie adăugat un al patrulea grup de testare în loc să fie utilizate intervale foarte mari între doze (de exemplu, mai mari decât un factor cuprins între 6-10). În general, un factor mai mare de 10 ar trebui evitat, iar acesta ar trebui justificat în cazul în care este utilizat.

27. Astfel cum este evidențiat în Ghidul nr. 116 (7), elementele de care ar trebui să se țină cont la selectarea dozei includ:

— non-linearități sau puncte de inflexiune cunoscute sau suspectate în relația doză-răspuns;

— toxicocinetică și intervale între doze la care apare sau nu apare fenomenul de inducție metabolică, saturație sau nelinearitate între dozele externe și interne;

— leziuni precursor, markeri de efect sau indicatori ai desfășurării unor procese biologice subiacente cheie;

▼M4

— aspecte cheie (sau suspectate) ale modului de acțiune, precum doze la care începe să se manifeste citotoxicitate, nivelurile hormonilor sunt perturbate, mecanismele homeostatice devin ineficiente etc.;

— regiuni ale curbei doză-răspuns în care sunt necesare estimări deosebit de robuste, de exemplu, în intervalul dozei de referință anticipate sau un prag suspectat;

— considerarea nivelurilor anticipate de expunere umană, în special la selectarea dozelor medii și reduse.

28. Grupul martor va fi un grup netratat sau un grup martor pentru vehicul în cazul în care pentru administrarea substanței chimice testate este utilizat un vehicul. Exceptând administrarea substanței chimice testate, animalele din grupul martor ar trebui tratate în mod identic cu cele din grupurile testate. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum utilizat de vehicul dintre grupurile de doză. Dacă o substanță chimică testată se administrează în alimente și provoacă reducerea semnificativă a apetitului ca urmare a modificării caracteristicilor organoleptice ale alimentelor, poate fi considerată necesară utilizarea, ca punct de referință mai adecvat, a unui grup martor hrănit în paralel.

Prepararea dozelor și administrarea substanței chimice testate

29. Substanța chimică testată se administrează de obicei pe cale orală, prin alimente sau apa de băut sau prin gavaj. Informații suplimentare privind căile și metodele de administrare sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7). Calea și metoda de administrare depind de scopul studiului, de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de biodisponibilitatea acesteia și de calea și metoda de expunere predominante la om. Alegerea căii și metodei de administrare ar trebui să fie justificată. În interesul bunăstării animalelor, gavajul oral ar trebui folosit, în mod normal, numai în cazul agenților pentru care această cale și această metodă de administrare corespunde unei căi de expunere potențiale rezonabile la om (de exemplu, produse farmaceutice). Pentru substanțele chimice alimentare și ambientale, inclusiv a pesticidelor, administrarea are loc de obicei prin hrană sau apa de băut. Totuși, în anumite situații, cum ar fi riscul de expunere profesională, administrarea pe alte căi poate fi mai potrivită.

30. Dacă este necesar, substanța chimică testată se dizolvă într-un vehicul adecvat. Ar trebui luate în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi, după caz: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței chimice testate, efectele asupra proprietăților chimice ale substanței chimice testate care i-ar putea afecta caracteristicile toxice, precum și efectele asupra consumului de alimente sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalelor. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior a unei soluții posibile în alte vehicule. Dacă vehiculul este altul decât apa, ar trebui să fie cunoscute proprietățile toxice ale vehiculului. Ar trebui să fie disponibile informații privind stabilitatea substanței chimice testate și a omogenității soluțiilor de dozare sau a alimentației (după caz) în condițiile de administrare (de exemplu, alimentație).

31. Pentru substanțele chimice administrate în alimente sau în apa de băut, este important să se ia măsuri astfel încât cantitățile de substanță chimică testată implicate să nu interfereze cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. În studiile de toxicitate pe termen lung care utilizează administrarea prin alimentație, concentrația substanței chimice testate din hrană nu ar trebui să depășească, în mod normal, o limită superioară de 5 % din alimentația totală, pentru a fi evitate dezechilibrele nutriționale. Când substanța chimică testată se administrează în hrană, se poate folosi fie o concentrație alimentară constantă (mg/kg hrană sau ppm), fie o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor (mg/kg greutate corporală), care se calculează săptămânal. Alternativa utilizată ar trebui precizată.

▼M4

32. În cazul administrării orale, animalele sunt expuse la o doză zilnică din substanța chimică testată (șapte zile pe săptămână) timp de 12 luni (etapa de toxicitate cronică) sau 24 de luni (etapa de carcinogenitate), a se vedea, de asemenea, punctele 33 și 34. Orice alt regim de dozare, cum ar fi cel de cinci zile/săptămână, ar trebui să fie justificat. În cazul administrării cutanate, animalele sunt, în mod normal, tratate cu substanța chimică testată timp de cel puțin 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, astfel cum se indică în capitolul B.9 din prezenta anexă (11), timp de 12 luni (etapa de toxicitate cronică) sau 24 de luni (etapa de carcinogenitate). Expunerea prin inhalare se desfășoară timp de 6 ore pe zi, 7 zile pe săptămână, dar dacă se justifică poate fi utilizată și o perioadă de expunere de 5 zile pe săptămână. Perioada de expunere variază de obicei între 12 luni (etapa de toxicitate cronică) și 24 de luni (etapa de carcinogenitate). Dacă speciile de rozătoare, altele decât șobolanii, sunt expuse numai în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi modificate pentru a reduce la minimum nivelurile de suferință specifice speciei. Orice durată de expunere mai mică de 6 ore pe zi ar trebui să fie justificată. A se vedea, de asemenea, capitolul B.8 din prezenta anexă (9).

33. Când substanța chimică testată se administrează animalelor prin gavaj, ar trebui să se folosească o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată, la aceleași ore în fiecare zi. În mod normal, o doză unică se administrează o dată pe zi, iar în cazurile în care, de exemplu, substanța chimică testată are efect iritant local, aceeași cantitate de doză zilnică poate fi administrată fracționat (de două ori pe zi). Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de greutatea animalului utilizat în scopuri experimentale. Volumul ar trebui menținut la un nivel cât mai redus posibil și nu ar trebui să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală la rozătoare (31). Se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin modificarea concentrațiilor, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile dozelor. Substanțele chimice potențial corozive sau iritante sunt exceptate de la această regulă și ar trebui să fie diluate pentru a evita efecte locale severe. Testele la concentrații care pot fi corozive sau iritante pentru tractul gastrointestinal ar trebui evitate.

Durata studiului

34. Perioada de administrare și durata etapei de toxicitate cronică tipice ale acestui studiu sunt de 12 luni, dar proiectul studiului permite și poate fi aplicat pentru studii cu durata mai scurtă (de exemplu, 6 sau 9 luni) sau mai lungă (de exemplu, 18 sau 24 de luni), în funcție de cerințele de reglementare sau în scopuri specifice de ordin mecanicist. Abaterile de la o perioadă de expunere de 12 luni ar trebui să fie justificate, în special atunci când aceasta este mai scurtă. Toate grupurile de doze alocate acestei etape vor fi oprite la momentul stabilit pentru evaluarea toxicității cronice și a patologiei non-neoplazice. Grupurile satelit utilizate pentru monitorizarea reversibilității oricăror modificări toxicologice induse de substanța chimică testată ar trebui menținute fără administrarea niciunei doze timp de cel puțin 4 săptămâni și cel mult o treime din durata totală a studiului după încetarea expunerii.

35. Durata tipică a etapei de evaluare a carcinogenității din acest studiu va fi de 24 de luni pentru rozătoare, reprezentând durata de viață normală pentru majoritatea animalelor utilizate. Pot fi utilizate durate mai scurte sau mai lungi ale studiului în funcție de durata de viață a sușei speciei de animale utilizate în cadrul studiului, dar acestea ar trebui să fie justificat. În cazul anumitor sușe de șoareci, de exemplu, AKR/J, C3H/J sau C57BL/6J, perioada de 18 luni poate fi mai adecvată. În cele ce urmează sunt prezentate câteva orientări privind durata, încetarea studiului și supraviețuirea; orientări suplimentare, inclusiv considerarea acceptabilității unui studiu de carcinogenitate negativ în legătură cu supraviețuirea în cadrul studiului, sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7):

▼M4

— încheierea studiului ar trebui avută în vedere atunci când numărul de animale supraviețuitoare din grupurile cu doză redusă sau din grupul martor scade sub 25 %;

— în cazul în care numai animalele din grupul tratat cu doza maximă mor prematur datorită toxicității, aceasta nu ar trebui să determine încheierea studiului;

— animalele supraviețuitoare ar trebui considerate separat, în funcție de sex;

— studiul nu ar trebui să fie extins dincolo de limita la care datele obținute nu mai sunt suficiente pentru a permite efectuarea unei evaluări valabile din punct de vedere statistic.

OBSERVAȚII (ETAPA DE TOXICITATE CRONICĂ)

36. Toate animalele ar trebui examinate pentru observarea semnelor de morbiditate și mortalitate de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv la sfârșit de săptămână și în zilele nelucrătoare. În cazul administrării prin gavaj, se recomandă ca examinările clinice generale să fie făcute cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare.

37. Toate animalele ar trebui să fie supuse unor observații clinice detaliate cel puțin o dată înainte de prima expunere (pentru a permite realizarea de comparații la același individ), la sfârșitul primei săptămâni de studiu și apoi lunar. Protocolul de observație ar trebui să fie proiectat astfel încât variațiile între observatorii individuali să fie reduse la minimum și independente de grupul testat. Aceste observații se recomandă să fie făcute în afara cuștii în care sunt ținute animalele, de preferință într-o incintă standardizată și la aceeași oră de fiecare dată. Ele ar trebui înregistrate cu atenție, de preferat folosind un sistem de notare definit explicit de laboratorul de testare. Ar trebui acționat pentru a se asigura că variațiile condițiilor de observare sunt minime. Observațiile ar trebui să includă, dar nu sunt limitate la modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, secrețiilor și excrețiilor și reacțiile neurovegetative (de exemplu, lăcrimare, piloerecție, dimensiunea pupilei, respirație neobișnuită). Se vor consemna, de asemenea, toate modificările de comportament, modificările posturii sau ale reacțiilor la manipulare, precum și apariția unor mișcări clonice sau tonice, a unor comportamente stereotipe (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate), precum și orice alt comportament bizar (automutilare, mers cu spatele) (32).

38. Toate animalele ar trebui supuse unui examen oftalmologic, cu un oftalmoscop sau un alt aparat adecvat, înainte de prima administrare a substanței chimice testate. La încheierea studiului, acest examen ar trebui să fie efectuat la toate animalele, însă cel puțin la animalele din grupul cu doza cea mai mare și din grupul martor. Dacă se constată modificări ale ochilor asociate tratamentului, ar trebui examinate toate animalele. În cazul în care analiza structurală sau alte informații sugerează toxicitate oculară, frecvența examenelor oculare ar trebui mărită.

39. În cazul substanțelor chimice ale căror teste anterioare de toxicitate cu doză repetată la 28 și/sau 90 de zile au indicat un potențial de inducere a efectelor neurotoxice și reacții la diferiți stimuli senzoriali (32) (auditivi, vizuali și proprioceptivi) (33) (34) (35), forța de prehensiune (36) și activitatea motorie (37) pot fi evaluate opțional înainte de începerea studiului și la perioade de 3 luni după aceasta, timp de cel mult 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă acesta durează mai mult de 12 luni). Detalii suplimentare referitoare la metodele utilizabile figurează în referințele bibliografice respective. Totuși, ar putea fi folosite și metode diferite de cele menționate.

▼M4

40. În cazul substanțelor chimice ale căror teste anterioare de toxicitate cu doză repetată la 28 și/sau 90 de zile au indicat un potențial de inducere a efectelor imunotoxice, investigații suplimentare ale acestui efect pot fi realizate opțional la încheierea studiului.

Greutatea corporală, consumul de hrană/apă și eficiența hranei

41. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul tratamentului și cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de hrană și eficiența alimentelor ar trebui măsurate cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, apoi cel puțin o dată pe lună. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa de băut, consumul de apă ar trebui măsurat cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Măsurarea consumului de apă ar trebui avută în vedere, de asemenea, în cadrul studiilor în care băutul apei suferă modificări.

Hematologie și biochimie clinică

42. În studiile la rozătoare, examinările hematologice ar trebui să fie realizate la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), la intervale de 3, 6 și 12 luni, precum și la încheierea studiului (dacă acesta durează mai mult de 12 luni). În studiile la șoareci, efectuarea tuturor analizelor hematologice impuse poate necesita utilizarea de animale satelit (a se vedea punctul 19). În studiile la specii de nerozătoare, se vor recolta probe de la un număr mai mic de animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și din același grup în cazul studiilor la câini), la intervale de prelevare intermediare și la încheierea studiului, în aceleași condiții descrise pentru rozătoare. Măsurătorile la intervale de trei luni la rozătoare sau la nerozătoare nu ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte asupra parametrilor hematologici. Probele de sânge ar trebui recoltate sub anestezie, din anumite locuri (de exemplu, prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital).

43. Ar trebui investigați următorii parametri (38): numărul total de leucocite și formula leucocitară, numărul de hematii, numărul de trombocite, concentrația hemoglobinei, hematocritul (volumul celular sangvin după centrifugare), media volumului globulelor (MCV), media globulară a hemoglobinei (MCH), concentrația medie a hemoglobinei (MCHC), timpul de protrombină și timpul de tromboplastină parțial activată. Alți parametri hematologici, cum sunt corpurile Heinz, morfologia atipică a hematiilor sau methemoglobina, pot fi măsurați, după caz, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În general, ar trebui adoptată o abordare flexibilă, în funcție de efectul observat și/sau scontat al substanței chimice testate în cauză. Dacă substanța chimică testată are un efect asupra sistemului hematopoietic, pot fi indicate, de asemenea, numărul de reticulocite și citologia măduvei osoase, chiar dacă aceste valori nu ar trebui măsurate în mod obișnuit.

44. Ar trebui efectuate analize de biochimie clinică în vederea investigării principalelor efecte toxice asupra țesuturilor și, în special, asupra ficatului și a rinichilor, pe probe de sânge prelevate de la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), la aceleași intervale de timp specificate pentru investigațiile hematologice. În studiile la șoareci, efectuarea tuturor analizelor de biochimie clinică impuse poate necesita utilizarea de animale satelit. În studiile la specii de nerozătoare, se vor recolta probe de la un număr mai mic de animale (de exemplu, 4 animale din fiecare sex și din același grup în cazul studiilor pe câini), la intervale de prelevare intermediare și la încheierea studiului, în aceleași condiții descrise pentru rozătoare. Măsurătorile la intervale de trei luni la rozătoare și la nerozătoare nu

▼M4

ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte asupra parametrilor de biochimie clinică. Se recomandă ca animalele să nu fie hrănite cu o noapte înainte de prelevarea probelor de sânge (cu excepția șoarecilor) ([1]). Ar trebui investigați următorii parametri (38): glucoză, uree (azot ureic), creatinină, proteine totale, albumină, calciu, sodiu, potasiu, colesterol total, cel puțin două teste adecvate pentru evaluare hepatocelulară (alanin-aminotransferază, aspartat-aminotransferază, glutamat-dehidrogenază, acizi biliari totali) (39) și cel puțin două teste adecvate de evaluare hepatobiliară (fosfatază alcalină, gama-glutamil transferază, 5'-nucleotidază, bilirubină totală, acizi biliari totali) (39). După caz, pot fi măsurați alți parametri de chimie clinică cum sunt trigliceridele à jeun, hormonii specifici și colinesteraza, în funcție de toxicitatea substanței chimice testate. În general, este nevoie de o abordare flexibilă, adaptată efectului observat și/sau scontat al substanței chimice testate în cauză.

45. Ar trebui efectuate analize de urină la toate animalele de studiu (10 masculi și 10 femele din fiecare grup), pe probe recoltate la aceleași intervale ca pentru analizele de hematologie și chimie clinică. Măsurătorile la intervale de trei luni nu ar trebui efectuate dacă într-un studiu anterior de 90 de zile, desfășurat la doze comparative, nu au fost constatate efecte în urma analizelor de urină. Următoarea listă de parametri a fost inclusă într-o recomandare a experților privind studiile de patologie clinică (38): aspectul, volumul, osmolalitatea sau greutatea specifică, pH-ul, proteinuria totală și glicozuria. Alte analize vizează corpii cetonici, urobilinogenul, bilirubina și hemoragiile oculte. Dacă este necesar, pot fi utilizați și alți parametri pentru extinderea investigării efectului (efectelor) observat(e).

46. În general, se consideră că variabilele de referință hematologice și de biochimie clinică ar trebui să fie stabilite înainte de tratament în cazul studiilor la câini, dar nu și în cazul studiilor la rozătoare (38). Totuși, dacă datele de referință istorice (a se vedea punctul 58) nu sunt adecvate, poate fi luată în considerare generarea unor astfel de date.

PATOLOGIE

Autopsia

47. În mod normal, toate animalele cuprinse în studiu sunt supuse unei autopsii complete și detaliate, care include examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor și a cavităților craniană, toracică și abdominală și a conținutului acestora. Cu toate acestea, pot fi stabilite prevederi care pot limita măsurătorile (în cazul grupurilor care urmează a fi sacrificate pe parcurs sau al grupurilor satelit) la măsurători cheie specifice, cum sunt neurotoxicitatea sau imunotoxicitatea (a se vedea punctul 21). Aceste animale nu ar trebui să fie supuse unei autopsii și procedurilor ulterioare descrise în punctele următoare. Animalele santinelă pot fi autopsiate de la caz la caz, la alegerea conducătorului studiului.

([1]) Pentru mai multe analize de ser și plasmă, în special pentru glucoză, este de preferat absența hranei în timpul nopții. Motivul principal este că variația crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efectele mai subtile și ar face dificilă interpretarea. Totuși, ar trebui reținut faptul că lipsa hranei pe durata nopții poate să interfereze cu metabolismul general al animalelor și riscă, în special în studiile în care substanța testată este administrată în alimente, să perturbe expunerea zilnică la această substanță. Toate animalele ar trebui să se afle în aceeași stare fiziologică în momentul evaluării și, prin urmare, se recomandă ca evaluările detaliate sau cele neurologice să aibă loc în alte zile decât cele în care au loc prelevările de probe pentru biochimie clinică.

▼**M4**

48. Se înregistrează greutatea organelor de la toate animalele, cu excepția celor prevăzute în ultima parte a punctului 47. Glandele suprarenale, creierul, epididimurile, inima, rinichii, ficatul, ovarele, splina, testiculele, glanda tiroidă (cântărită după fixare, împreună cu glandele paratiroide) și uterul de la toate animalele (cu excepția celor găsite muribunde și/sau a celor sacrificate pe parcurs) sunt curățate de țesuturile aderente, după caz, și cântărite proaspete cât mai repede după disecție, pentru a evita deshidratarea.

49. Țesuturile următoare ar trebui să fie conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic ulterior (40) (țesuturile între paranteze pătrate sunt opționale):

toate leziunile macroscopice	inimă	pancreas	stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)
glanda suprarenală	ileon	glanda paratiroidă	[dinți]
aortă	jejun	nervi periferici	testicule
creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebel și bulb rahidian/punte)	rinichi	glanda pituitară	timus
cecum	glanda lacrimală (extraorbitală)	prostată	glanda tiroidă
cervix	ficat	rect	[limbă]
glanda coagulantă	plămân	glanda salivară	trahee
colon	ganglioni limfatici (superficiali și profunzi)	vezicula seminală	vezica urinară
duoden	glanda mamară (obligatoriu pentru femele, iar dacă poate fi disecată, și la masculi)	mușchi scheletici	uter (inclusiv cervix)
epididim	[căile respiratorii superioare, inclusiv nas, fose nazale și sinusurile paranazale]	piele	[ureter]
ochi (inclusiv retina)	esofag	măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar)	[uretra]
[femur, inclusiv articulația]	[bulbul olfactiv]	splina	vaginul
vezica biliară (la specii altele decât șobolanul)	ovar	[stern]	probă de măduvă osoasă și/sau o puncție aspirativă de măduvă osoasă
glanda Harder			

▼M4

În cazul organelor pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui conservate ambele organe. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea orală și este necesară prelevarea și conservarea specifică a pielii de la locul aplicării. În studiile cu administrare prin inhalare, lista țesuturilor conservate și examinate din căile respiratorii ar trebui să urmeze recomandările conținute în capitolele B.8 (9) și B.29 (10) din prezenta anexă. În cazul altor organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specifice prelevate din tractul respirator), ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală.

Examenul histopatologic

50. Sunt disponibile orientări privind bunele practici de realizare a studiilor de patologie toxicologică (40). Ar trebui să fie examinate cel puțin următoarele țesuturi:

— toate țesuturile animalelor din grupurile expuse la doza maximă și din grupurile martor;

— toate țesuturile animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe parcurs;

— toate țesuturile care prezintă anomalii macroscopice, inclusiv tumorile;

— atunci când la grupul expus la doza maximă sunt observate țesuturi-țintă sau țesuturi care prezintă modificări histopatologice în legătură cu tratamentul, se vor examina aceleași țesuturi la toate animalele din toate celelalte grupuri de doză;

— în cazul organelor-pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui examinate ambele organe.

OBSERVAȚII (ETAPA DE CARCINOGENITATE)

51. Toate animalele ar trebui examinate pentru observarea semnelor de morbiditate și mortalitate de două ori pe zi, de regulă la începutul și la sfârșitul fiecărei zile, inclusiv la sfârșit de săptămână și în zilele nelucrătoare. În plus, animalele ar trebui examinate o dată pe zi pentru semne specifice cu relevanță toxicologică. În cazul studiilor cu administrare prin gavaj, animalele ar trebui să fie examinate în perioada imediat următoare administrării dozei. Ar trebui acordată o atenție specială dezvoltării tumorale și ar trebui înregistrate momentul apariției, localizarea, dimensiunile, aspectul și dezvoltarea tumorilor atât a celor vizibile macroscopic, cât și a celor palpabile.

52. Toate animalele ar trebui să fie cântărite la începutul tratamentului și cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de hrană și eficiența alimentelor ar trebui măsurate cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, apoi cel puțin o dată pe lună. Atunci când substanța chimică testată se administrează în apa de băut, consumul de apă ar trebui măsurat cel puțin o dată pe săptămână în primele 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată pe lună. Consumul de apă poate fi măsurat și în cadrul studiilor în care băutul apei suferă modificări.

▼M4

Hematologie, biochimie chimică și alte măsurători

53. Pentru a crește volumul de informații obținut din studiu, în special în ceea ce privește modul de acțiune, pot fi prelevate probe de sânge pentru examene hematologice și de biochimie clinică, însă decizia privind aceste prelevări aparține conducătorului studiului. De asemenea, pot fi adecvate analize ale urinei. Datele privind animalele utilizate în etapa de toxicitate cronică a studiului, a cărei durată tipică este de 12 luni (punctul 34), vor oferi informații referitoare la acești parametri. Orientări suplimentare privind utilitatea prelevării acestor probe în cadrul studiului de carcinogenitate sunt furnizate în Ghidul nr. 116 (7). Dacă se prelevează probe de sânge, acestea ar trebui colectate la încheierea perioadei de testare, imediat înainte de sacrificarea animalelor sau ca parte a acestei proceduri. Probele de sânge ar trebui recoltate sub anestezie, dintr-un loc stabilit (de exemplu, prin puncție cardiacă sau din sinusul retro-orbital). De asemenea, pot fi preparate frotiuri sangvine pentru a fi examinate, în special atunci când organul țintă pare a fi măduva osoasă, deși valoarea examinării frotiurilor sangvine în etapa de carcinogenitate a studiului pentru evaluarea potențialului cancerigen/oncogen a fost pusă sub semnul întrebării (38).

PATOLOGIE

Autopsia

54. Toate animalele care participă la studiu, cu excepția animalelor santinelă și a altor animale satelit (a se vedea punctul 20), sunt supuse unei autopsii macroscopice complete și detaliate, care include examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor și a cavităților craniană, toracică și abdominală și a conținutului acestora. Animalele santinelă și animalele satelit pot fi autopsiate de la caz la caz, la alegerea conducătorului studiului. Cântărirea organelor nu este inclusă de obicei în studiul de carcinogenitate, deoarece modificările asociate îmbătrânirii și, ulterior, dezvoltarea tumorilor reduc utilitatea datelor privind greutatea organelor. Totuși, acestea pot fi importante în evaluările în funcție de greutatea probelor și, în special, ale modului de acțiune. Dacă fac parte dintr-un studiu satelit, aceste date ar trebui colectate în termen de cel mult un an de la începerea studiului.

55. Țesuturile următoare ar trebui conservate în mediul de fixare cel mai adecvat atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic ulterior (40) (țesuturile între paranteze pătrate sunt opționale):

toate leziunile macroscopice	inimă	pancreas	stomac (stomacul anterior, stomacul glandular)
glanda suprarenală	ileon	glanda paratiroidă	[dinți]
aortă	jejun	nervi periferici	testicule
creier (inclusiv secțiuni din creierul mare, cerebelul și bulb rahidian/punte)	rinichi	glanda pituitară	timus
cec	glanda lacrimală (extraorbitală)	prostată	glanda tiroidă
cervix	ficat	rect	[limbă]
glanda coagulantă	plămân	glanda salivară	trahee
colon	ganglioni limfatici (superficiali și profunzi)	vezicula seminală	vezica urinară

▼M4

duoden	glanda mamară (obligatoriu pentru femele, iar dacă poate fi disecată, și la masculi)	mușchi scheletici	uter (inclusiv cervix)
epididim	[căile respiratorii superioare, inclusiv nas, fose nazale și sinusurile paranazale]	piele	[ureter]
ochi (inclusiv retina)	esofag	măduva spinării (din trei segmente: cervical, medio-toracic și lombar)	[uretra]
[femur, inclusiv articulația]	[bulb olfactiv]	splina	vaginul
vezica biliară (la specii altele decât șobolanul)	ovar	[stern]	probă de măduvă osoasă și/sau o puncție aspirativă de măduvă osoasă
glanda Harder			

În cazul organelor pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui conservate ambele organe. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică testată, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia. În studiile care implică administrarea pe cale cutanată, ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală ar trebui examinată și în cazul studiilor cu administrare cutanată și este necesară prelevarea și conservarea specifică a pielii de la locul aplicării. În studiile cu administrare prin inhalare, lista țesuturilor din căile respiratorii care au fost conservate și examinate ar trebui să urmeze recomandările conținute în capitolele B.8 (8) și B.29 din prezenta anexă (9). În cazul altor organe/țesuturi (și suplimentar față de țesuturile conservate specifice prelevate din căile respiratorii), ar trebui examinată lista de organe stabilită pentru calea de administrare orală.

Examenul histopatologic

56. Sunt disponibile orientări privind bunele practici de realizare a studiilor de patologie toxicologică (40). Ar trebui să fie examinate cel puțin următoarele țesuturi:

— toate țesuturile animalelor din grupurile expuse la doza maximă și din grupurile martor;

— toate țesuturile animalelor care au murit sau au fost sacrificate pe durata studiului;

— toate țesuturile care prezintă anomalii macroscopice, inclusiv tumorile;

— atunci când la grupul expus la doza maximă sunt observate modificări histopatologice apărute ca urmare a tratamentului, se vor examina aceleași țesuturi la toate animalele din toate celelalte grupuri de doză;

— în cazul organelor-pereche (de exemplu, rinichi sau glande suprarenale), ar trebui examinate ambele organe.

▼M4

DATE ȘI RAPORT (CARCINOGENITATE ȘI TOXICITATE CRONICĂ)

Date

57. Ar trebui furnizate date obținute de la fiecare animal, pentru toți parametrii evaluați. În plus, toate datele ar trebui rezumate în formă tabelară, pentru fiecare grup utilizat în scopuri experimentale indicându-se numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în timpul testului sau eutanasiate din motive umane și momentul morții sau al eutanasierii acestora, numărul de animale care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul apariției acestora, durata și severitatea oricăror efecte toxice, numărul animalelor care au prezentat leziuni, tipul leziunilor și procentul animalelor care au prezentat fiecare tip de leziune. Ar trebui ca mediile și deviațiile standard (pentru datele de test colectate continuu) ale animalelor care prezintă efecte toxice sau leziuni, suplimentar față de clasificarea leziunilor, să fie indicate în tabele rezumative.

58. Datele istorice de control pot fi utile în interpretarea rezultatelor studiului, de exemplu, în cazul în care există indicii potrivit cărora datele furnizate de grupurile martor paralele diferă substanțial față de datele recente provenite de la animale martor din același laborator de test/colonie. Dacă sunt evaluate, datele istorice de control ar trebui să fie transmise de la același laborator, să se refere la animale de aceeași vârstă și din aceeași sușă și să fi fost obținute într-o perioadă de cel mult cinci ani înainte de studiul în cauză.

59. Dacă este posibil, rezultatele numerice ar trebui evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Metodele statistice și datele care urmează să fie analizate ar trebui să fie selecționate în timpul proiectării studiului (punctul 9). Dacă este necesar, procesul de selecție ar trebui să prevadă ajustări privind animalele supraviețuitoare.

60. Raportul de testare ar trebui să conțină următoarele informații:

Substanța chimică testată:

— natura fizică, puritatea și proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare;

— sursa substanței chimice;

— numărul lotului;

— certificatul de analiză chimică.

Vehiculul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului (dacă acesta este altul decât apa).

Animalele utilizate în scopuri experimentale:

— speciile/sușa utilizată și justificarea opțiunii;

— numărul, sexul și vârsta animalelor la începutul testului;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutului testului.

▼M4

Condițiile de testare:

— justificarea căii de administrare și a dozei alese;

— metodele statistice utilizate pentru analiza datelor, dacă este cazul;

— detalii privind formula substanței chimice testate/prepararea hranei;

— date analitice privind concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— calea de administrare și detalii privind administrarea substanței chimice testate;

— în cazul studiilor prin inhalare se specifică dacă este expus întregul corp sau numai nasul;

— dozele efective (mg/kg greutate corporală/zi) și factorul de conversie a concentrației substanței chimice testate din hrană sau apa de băut (mg/kg sau ppm) în doza efectivă, dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei.

Rezultate (se prezintă date tabelare rezumate și date individuale privind animalele):

Date generale:

— date privind supraviețuirea;

— greutatea corporală/modificările greutății corporale;

— consumul de hrană, calculul eficiența hranei (dacă a fost efectuat) și consumul de apă, după caz;

— date toxicocinetice, dacă sunt disponibile;

— date ale examenului oftalmoscopic (dacă sunt disponibile);

— date hematologice (dacă sunt disponibile);

— date de chimie clinică (dacă sunt disponibile).

Concluziile clinice:

— semne de toxicitate;

— incidența (și severitatea, dacă a fost evaluată) oricărei anomalii;

— natura, severitatea și durata observațiilor clinice (temporare sau permanente).

Datele privind autopsia:

— greutatea corporală la finalul studiului;

— greutatea organelor și raportul dintre acestea și greutatea corporală, după caz;

— rezultatele autopsiei; incidența și gravitatea anomaliilor.

Examenul histopatologic:

— rezultate histopatologice non-neoplazice;

— rezultate histopatologic neoplazice;

▼**M4**

— corelația între observațiile macroscopice și microscopice;

— descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice care au legătură cu tratamentul, inclusiv clasificarea severității;

— orice raport de evaluare științifică a lamelelor.

Interpretarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor, care include următoarele aspecte:

— discutarea metodelor de modelare;

— relațiile doză-răspuns;

— datele istorice de control;

— analiza oricăror informații privind modul de acțiune;

— determinarea BMD, NOAEL sau LOAEL;

— relevanța pentru om.

Concluzii.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (1995), Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005), Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004), A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System, ATLA 32: 163-208

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002), Hazard identification by methods of animal-based toxicology, Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003), Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview, Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(6) Capitolul B.27 din prezenta anexă, „Test de toxicitate orală subcronică. Studiu de 90 de zile de toxicitate orală cu doză repetată la nerozătoare”.

(7) OECD (2012), Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, disponibil pe site-ul internet public al OCDE referitor la orientările privind testele, la adresa www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolul B.8 din prezenta anexă, „Toxicitate subacută prin inhalare: studiu de 28 de zile”.

(10) Capitolul B.29 din prezenta anexă, „Toxicitate subcronică prin inhalare: studiu de 90 de zile”.

(11) Capitolul B.9 din prezenta anexă, „Toxicitate la doză repetată (28 de zile) (administrare cutanată)”.

▼**M4**

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006), IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans, Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003), The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview, Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006), Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk, Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003), A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action, Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006), Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements, Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002), Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007), Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection, Crit. Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997), Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (ed.), ILSI Press, Washington, D.C.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N. and Lumley C.E. (1994), The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals, The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A. and Lumley C.E. (1996), The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. În D'Arcy P.O.F. & Harron D.W.G. (eds.), Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997), The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry, Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23, Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989), Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments, ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006), Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001), A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986), Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980), Utility of the Neurologic Examination in Rats, Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad S.C. (1982), A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology, J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991), Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz, Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979), A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice, Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991), Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996), Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004), Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanța chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼B

B.34. STUDIU DE TOXICITATE PRIVIND REPRODUCEREA LA O GENERAȚIE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

A se vedea introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

A se vedea introducerea generală partea B.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se administrează în doze crescătoare mai multor loturi de masculi și femele. Masculii trebuie tratați în timpul perioadei de creștere și pe durata a cel puțin unui ciclu spermatogen complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan), astfel încât substanța de testat să își producă efectele adverse asupra spermatogenezei.

Femelele din generația parentală (P) trebuie să fie tratate pe perioada a cel puțin două cicluri estrale complete astfel încât substanța de testat să producă efectele adverse asupra ciclului estral. Apoi animalele sunt împerecheate. Substanța de testat se administrează ambelor sexe în perioada împerecherii, iar apoi numai femelelor în perioada gestației și a alăptării. În cazul administrării prin inhalare, metoda va fi adaptată.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Niciunul.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. Pregătire

Înainte de testare, animalele tinere sănătoase se repartizează aleatoriu în loturi tratate și loturi martor. Se țin animalele în condițiile de adăpostire și de hrănire specifice experimentului cel puțin în cele 5 zile care îl preced. Se recomandă ca substanța de testat să se administreze în hrană sau în apa de băut. Și alte căi de administrare sunt acceptabile. Aceeași metodă de administrare va fi utilizată pentru toate animalele pe tot parcursul experimentului. Dacă se folosește un vehicul sau alți aditivi pentru a facilita administrarea, aceștia trebuie să nu aibă producă toxice. Tratamentul se face zilnic, șapte zile pe săptămână.

▼B

1.6.2. Animale de experiență

Alegerea speciei

Specia preferată este șoarecele sau șobolanul. Se folosesc animale sănătoase, care nu au mai fost supuse anterior altor experimente. Nu se recomandă folosirea liniilor cu fertilitate scăzută. Animalele de experiență trebuie caracterizate în termeni de specie, linie de descendență, sex, greutate și/sau vârstă.

Pentru o evaluare corespunzătoare a fertilității se studiază atât femelele, cât și masculii. Toate animalele tratate și cele martor trebuie înțărcate înainte de a începe tratamentul.

Număr și sex

Fiecare lot martor și fiecare lot tratat trebuie să conțină suficiente animale pentru a se asigura un număr de 20 de femele gestante în momentul sau aproape de momentul fătării.

Obiectivul este acela de a avea un număr suficient de femele gestante și descendenți pentru a asigura o evaluare reprezentativă a potențialului substanței de testat de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul matern la animalele din generația P, precum și suptul, creșterea și dezvoltarea la descendenții F_1, de la concepție până la înțărcare.

1.6.3. Condiții de testare

Hrana și apa trebuie furnizate *ad libitum*. În apropierea parturiției, femelele gestante se izolează în cuști speciale de fătare sau maternitate și pot primi materiale pentru construirea culcușului.

1.6.3.1. Doze

Se utilizează cel puțin trei doze și un lot martor. Dacă pentru administrarea substanței de testat se folosește un vehicul, acesta i se administrează lotului martor în volumul maxim folosit în experiment. Dacă substanța de testat conduce la scăderea consumului zilnic de hrană, ar putea fi necesar un lot martor hrănit identic. În mod ideal, dacă nu există limite impuse de natura fizică/chimică ori de efectele biologice ale substanței de testat, doza maximă trebuie să inducă efecte toxice, dar nu și mortalitate la animalele parentale (P). Doza sau dozele intermediare trebuie să inducă efecte toxice minime atribuibile substanței de testat, iar doza minimă nu trebuie să determine efecte adverse observabile la părinți sau descendenți. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj sau sub formă de capsule, doza trebuie stabilită în funcție de greutatea corporală a fiecărui animal în parte și ajustată săptămânal, în funcție de modificările în greutatea corporală. În cazul femelelor gestante, administrarea dozelor se poate face, dacă se dorește, în funcție de greutatea corporală în ziua 0 sau 6 de graviditate.

1.6.3.2. Test-limită

În cazul substanțelor cu toxicitate scăzută, dacă o doză de cel puțin 1 000 mg/kg nu prezintă nicio interferență asupra capacității de reproducere, continuarea experienței poate fi inutilă. Dacă un studiu preliminar cu doza maximă relevă o toxicitate maternă evidentă, dar nu prezintă efecte adverse asupra fertilității, atunci nu mai sunt necesare studii cu alte doze.

▼B

1.6.3.3. Desfășurarea testului

Schema de tratament

Administrarea tratamentului zilnic la masculii parentali (P) poate începe când aceștia au între cinci și nouă săptămâni, după ce au fost înțărcați și aclimatizați timp de cel puțin cinci zile. La șobolani, administrarea substanței continuă timp de 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere (la șoareci, timp de opt săptămâni). Masculii trebuie sacrificați și examinați fie la sfârșitul perioadei de împerechere, fie, alternativ, pot fi păstrați primind regimul alimentar prevăzut în test, în vederea unei împerecheri ulterioare, fiind sacrificați și examinați înainte de terminarea studiului. În cazul femelelor parentale (P), administrarea zilnică trebuie să înceapă după cel puțin cinci zile de aclimatizare și să continue timp de cel puțin două săptămâni înainte de împerechere. Administrarea zilnică a dozei de tratament femelelor P continuă în perioada de trei săptămâni de împerechere, pe parcursul gestației și până la înțărcarea descendenților F_1. Se poate avea în vedere modificarea schemei de tratament pe baza altor informații disponibile cu privire la substanța de testat cum ar fi inducerea metabolismului sau bioacumularea.

Procedura de împerechere

Pentru studiile de toxicitate privind reproducerea, schemele de împerechere folosite pot fi: un mascul la o femelă (1:1) sau un mascul la două femele (1:2).

În varianta împerecherii 1:1, o femelă este plasată împreună cu același mascul până când se produce fecundarea sau trec trei săptămâni. În fiecare dimineață femelele trebuie examinate pentru a identifica prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua „0” a sarcinii este definită ca fiind ziua în care se identifică prezența dopului vaginal sau a spermei în vagin.

Animalele care nu s-au împerecheat trebuie evaluate pentru a stabili cauza aparentei infertilități.

Evaluarea poate presupune posibilități suplimentare de împerechere cu alte exemplare dovedite ca fiind apte, examinarea microscopică a organelor de reproducere, precum și examinarea ciclului estral și a spermatogenezei.

Mărimea seriei de pui

Animalele tratate în timpul studiului de fertilitate fată normal și își cresc puii până la înțărcare, fără a se face o standardizare numerică a seriei de pui.

Dacă are loc standardizarea numerică, se recomandă următoarea metodă. Între zilele 1 și 4 după fătare se ajustează numărul fetilor, eliminând surplusul de pui prin selecție astfel încât să se obțină un număr de patru pui masculi și patru pui femele pentru fiecare serie de pui.

Dacă numărul de masculi sau femele fătate nu permite obținerea unui număr de patru pui de fiecare sex, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, cinci masculi și trei femele). Ajustările nu se aplică în cazul seriilor cu mai puțin de opt pui.

▼B

1.6.4. Observațiile

Pe toată durata testului, fiecare animal trebuie observat cel puțin o dată pe zi. Se înregistrează modificările comportamentale semnificative, semnele unor fătări dificile sau prelungite și toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. În timpul perioadelor de pre-împerechere și de împerechere se măsoară zilnic consumul de hrană. După fătare și în perioada lactației, consumul de hrană (și de apă, în cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut) se măsoară în ziua în care se cântăresc puii. Masculii și femelele din generația P se cântăresc în prima zi a tratamentului, apoi săptămânal. Aceste observații se înregistrează pentru fiecare animal adult în parte.

Perioada gestației trebuie calculată din ziua 0 de graviditate. Fiecare serie de pui proveniți de la o gestantă trebuie examinat imediat după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, numărul de pui vii și morți, precum și prezența anomaliilor macroscopice.

Puii morți și puii sacrificați în ziua a patra trebuie conservați și studiați în vederea identificării posibilelor anomalii. Puii vii se numără și se cântăresc în dimineața de după naștere, în ziua a patra și a șaptea, ulterior săptămânal până la încheierea studiului, când animalele se cântăresc individual.

Anomaliile fizice sau comportamentale observate la femele sau la descendenți trebuie înregistrate.

1.6.5. Patologie

1.6.5.1. Autopsia

În momentul sacrificării sau al decesului în timpul studiului, toate animalele din generația P sunt supuse unui examen macroscopic în vederea evidențierii anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice, o atenție deosebită acordându-se organelor sistemului de reproducere. Puii muribunzi sau morți se examinează în vederea decelării eventualelor anomalii.

1.6.5.2. Examen histopatologic

În vederea examinării microscopice, de la toate animalele P se conservă următoarele organe: ovare, uter, cervix, vagin, testicule, epididim, vezicule seminale, prostată, glanda coagulantă, glanda pituitară și organul sau organele țintă. În cazul în care aceste organe nu au fost examinate în cadrul altor studii cu doză multiplă, se efectuează un examen microscopic al tuturor animalelor din lotul martor și din lotul tratat cu doza maximă și, dacă este posibil, al animalelor care mor pe perioada studiului.

Dacă la aceste animale se evidențiază anomalii, organele respective se examinează la toate celelalte animale P. În aceste cazuri, se examinează microscopic toate țesuturile care prezintă modificări patologice macroscopice. După cum s-a arătat în paragraful referitor la procedura de împerechere, organele de reproducere ale animalelor suspectate de infertilitate trebuie examinate microscopic.

▼B

2. **DATE**

Datele se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare lot de experiență, numărul de animale la începutul testului, numărul de masculi fertili, numărul de femele gestante, tipurile de modificări și procentul de animale care prezintă fiecare tip de modificare.

Dacă este posibil, rezultatele se evaluează printr-o metodă statistică adecvată. Poate fi folosită orice metodă statistică recunoscută.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— specia/linia folosită;

— răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și viabilitatea;

— momentul morții în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit studiului;

— tabel cu greutatea corporală pentru fiecare serie de pui, greutatea corporală medie a puilor și greutățile corporale individuale la încheierea studiului;

— efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, descendenților și evoluției postnatale;

— ziua observării oricărui simptom anormal și evoluția acestuia;

— greutatea corporală a animalelor P;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor microscopice;

— tratarea statistică a rezultatelor, după caz;

— discutarea rezultatelor;

— interpretarea rezultatelor.

3.2. EVALUARE ȘI INTERPRETARE

A se vedea introducerea generală partea B.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

A se vedea introducerea generală partea B.

▼B

B.35. STUDIU DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA A DOUĂ GENERAȚII

1. METODĂ

Această metodă corespunde Orientării 416 (2001) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare a reproducerii pe durata a două generații este concepută pentru a furniza informații generale privind efectele unei substanțe de testat asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin, inclusiv asupra funcției gonadice, ciclului estral, comportamentului de împerechere, concepției, gestației, fătării, alăptării și înțărcării și asupra creșterii și dezvoltării descendenților. Studiul poate furniza, de asemenea, informații privind efectele substanței de testat asupra morbidității și mortalității neonatale și date preliminare privind toxicitatea asupra dezvoltării prenatale și postnatale și poate constitui un ghid pentru testele ulterioare. Această metodă de testare nu studiază doar creșterea și dezvoltarea generației F_1, ci evaluează, de asemenea, integritatea și funcționarea sistemelor de reproducere masculin și feminin, precum și creșterea și dezvoltarea generației F_2. Pentru informații suplimentare privind toxicitatea asupra dezvoltării și deficiențele funcționale, fie pot fi incluse în acest protocol secvențe suplimentare de studiu, consultând metodele pentru toxicitatea asupra dezvoltării și/sau neurotoxicitatea asupra dezvoltării, după caz, fie aceste puncte finale pot fi studiate în cadrul unor studii separate, utilizând metodele de testare adecvate.

1.2. PRINCIPIILE METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se administrează în doze graduale mai multor grupuri de masculi și femele. Substanța se administrează masculilor din generația P în timpul creșterii și cel puțin pe durata unui ciclu spermatogenetic complet (aproximativ 56 de zile la șoarece și 70 de zile la șobolan) pentru a pune în evidență efectele adverse asupra spermatogenezei. Efectele asupra spermei se determină în funcție de mai mulți parametri ai spermei (de exemplu, morfologia și motilitatea spermatozoizilor) și prin preparate de țesut și examene histopatologice detaliate. Dacă sunt disponibile date privind spermatogeneza dintr-un studiu anterior cu doze repetate cu o durată suficientă, de exemplu un studiu de 90 de zile, masculii din generația P nu este necesar să fie incluși în evaluare. Se recomandă totuși ca eșantioanele și înregistrările digitale ale spermei din generația P să fie păstrate, pentru a permite o evaluare ulterioară. Substanța se administrează femelelor din generația P în timpul creșterii și pe durata mai multor cicluri estrale complete pentru a detecta orice efecte adverse produse asupra normalității ciclului estral de către substanța de testat. Substanța de testat se administrează animalelor din generația parentală (P) în perioada împerecherii, pe durata gestațiilor ulterioare și până la înțărcarea descendenților lor din generația F_1. După înțărcare, substanța se administrează în continuare descendenților F_1 în perioada de creștere și la vârsta adultă și în perioada de împerechere și producere a generației F_2, până la înțărcarea generației F_2.

Observațiile clinice și examenele patologice se efectuează asupra tuturor animalelor pentru detectarea semnelor de toxicitate, acordându-se o atenție specială efectelor asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin și asupra creșterii și dezvoltării descendenților.

▼B

1.3. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.3.1. **Selectarea speciei de animale**

Specia preferată pentru testare este șobolanul. Dacă se utilizează o altă specie, această opțiune se justifică și este necesar să se facă modificările adecvate. Nu se utilizează liniile cu o fecunditate scăzută sau o incidență ridicată bine-cunoscută a defectelor de dezvoltare. La începutul studiului, variațiile în greutate între animalele utilizate trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex.

1.3.2. **Condiții de adăpostire și de hrănire**

În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență, se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C). Se asigură o umiditate relativă de 50-60 %, cu o valoare minimă de 30 % și o valoare maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se ilumineză artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Animalele pot fi grupate în cuști în funcție de doză, dar numărul animalelor dintr-o cușcă nu trebuie să împiedice observarea corectă a fiecărui animal. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a încorpora în hrană substanța de testat, dacă se administrează prin această metodă.

Animalele se adăpostesc individual sau în grupuri mici de același sex. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. După constatarea copulației, femelele împerecheate se adăpostesc individual în cuști amenajate pentru fătare și maternitate. Șobolanii împerecheați pot fi adăpostiți în grupuri mici, dar se separă cu una sau două zile înainte de fătare. Când se apropie momentul fătării, animalelor împerecheate li se asigură materialele adecvate și determinate pentru construirea cuibului.

1.3.3. **Pregătirea animalelor**

Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin 5 zile înainte și nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Pentru animalele de experiență se precizează specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și/sau vârsta. Este necesar să se cunoască legăturile colaterale dintre animale, pentru a se evita împerecherea între cosangvini. Animalele se distribuie aleatoriu în grupurile martor și de testare (se recomandă gruparea în funcție de greutate). Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea lor să fie reduse la minimum. Fiecărui animal i se atribuie un număr unic de identificare. La animalele din generația P, identificarea se face înainte de începerea tratamentului. La animalele din generația F_1, identificarea se face la înțărcare, pentru animalele selectate pentru împerechere. Pentru toate animalele selectate din generația F_1 se înregistrează cuibul de origine. În plus, dacă se au în vedere cântărirea individuală a puilor sau orice alte teste funcționale, se recomandă ca identificarea individuală a puilor să se efectueze cât mai curând posibil după fătare.

Animalele din generația P trebuie să aibă circa 5 până la 9 săptămâni la începutul tratamentului. Se recomandă ca animalele din toate grupurile de tratament să aibă, în cea mai mare măsură posibilă, greutăți și vârste apropiate.

▼B

1.4. MOD DE LUCRU

1.4.1. **Numărul și sexul animalelor**

Fiecare grup de tratament și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de animale pentru a obține, de preferat, cel puțin 20 de femele gestante în momentul sau în apropierea momentului fătării. În cazul substanțelor care cauzează efecte nedorite corelate tratamentului (de exemplu, sterilitate, toxicitate excesivă, la cea mai mare doză), există riscul ca acest lucru să nu fie posibil. Obiectivul este obținerea unui număr suficient de femele gestante pentru a asigura o evaluare relevantă a potențialului substanței de a afecta fertilitatea, gestația și comportamentul mamei și alăptarea, creșterea și dezvoltarea descendenților F_1 de la concepție până la maturitate, precum și dezvoltarea descendenților acestora (F_2), până la înțărcare. Prin urmare, faptul că nu se obține numărul dorit de animale gestante (20) nu invalidează obligatoriu studiul și se evaluează de la caz la caz.

1.4.2. **Pregătirea dozelor**

Se recomandă ca substanța de testat să se administreze oral (în hrană, în apa potabilă sau prin gavaj), cu excepția cazului în care o altă cale de administrare (de exemplu, prin absorbție dermică sau inhalare) este considerată a fi mai adecvată.

Dacă este necesar, substanța de testat se dizolvă într-un vehicul adecvat. Se recomandă, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi o soluție/emulsie în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior o altă soluție posibilă într-un alt vehicul. Pentru alte vehicule decât apa, este necesar să se cunoască proprietățile toxice ale vehiculului. Se determină stabilitatea substanței de testat în vehicul.

1.4.3. **Dozare**

Se utilizează cel puțin trei niveluri ale dozei și un martor paralel. Cu excepția cazului în care există limite impuse de natura fizico-chimică sau de efectele biologice ale substanței de testat, doza cea mai mare se alege astfel încât să inducă toxicitate, dar nu decesul sau o suferință profundă. În cazul unei mortalități neașteptate, studiile cu o rată a mortalității mai mică decât circa 10 procente la animalele din generația parentală (P) este totuși acceptabil, în mod normal. Se alege o serie de administrare în ordine descrescătoare a dozelor, pentru a pune în evidență o eventuală relație doză-efect și nivelul dozei fără efect advers vizibil (NOAEL). Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și este deseori de preferat să se adauge un al patrulea grup de tratament în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze. Pentru studiile cu administrare în hrană, intervalul între doze nu trebuie să depășească un factor de trei. Nivelurile dozelor se selectează ținând seama de datele existente privind toxicitatea, în special de rezultatele studiilor cu doze repetate. Se iau, de asemenea, în considerare orice informații disponibile cu privire la metabolismul și cinetica compusului de testat sau ale materialelor înrudite. În plus, informațiile în cauză se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra că regimul de dozare este adecvat.

▼B

Grupul martor nu este supus tratamentului sau i se administrează exclusiv vehiculul, în cazul în care pentru administrarea substanței de testat se utilizează un vehicul. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor sunt manipulate în același fel ca animalele din grupul de tratament. Dacă se utilizează un vehicul, grupului martor i se administrează cel mai mare volum utilizat de vehicul. Dacă substanța de testat se administrează în amestec cu hrana și provoacă o reducere a aportului și consumului de hrană, poate fi considerată necesară utilizarea unui grup martor hrănit în paralel. Alternativ, se pot utiliza date obținute din studii controlate, concepute pentru evaluarea efectelor unui consum redus de hrană asupra parametrilor reproducerii în locul unui grup martor simultan, hrănit în paralel.

Se iau în considerare următoarele caracteristici ale vehiculului și ale altor aditivi: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției de substanță de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care ar putea modifica caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau apă sau asupra stării nutriționale a animalelor.

1.4.4. **Testul-limită**

Dacă un studiu oral cu o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării în amestec cu hrana sau apa potabilă, un procentaj echivalent în hrana sau apa potabilă, efectuat conform procedurilor descrise pentru prezentul studiu, nu produce efecte toxice evidente nici la animalele din generația parentală, nici la descendenții acestora și, dacă, pe baza datelor privind compușii înrudiți structural și/sau metabolic, nu se prevede niciun efect toxic, este posibil să nu fie necesar un studiu complet cu mai multe niveluri ale dozei. Se efectuează testul-limită, cu excepția cazului în care expunerea umană indică necesitatea de a utiliza un nivel al dozei administrate oral mai ridicat. În cazul altor căi de administrare, precum inhalarea sau aplicarea cutanată, proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat, precum solubilitatea, pot indica și limita, deseori, nivelul maxim de expunere posibil de realizat.

1.4.5. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța de testat zilnic, 7 zile din 7. Se preferă administrarea pe cale orală (în amestec cu hrana, apa potabilă sau prin gavaj). Alegerea unei alte căi de administrare trebuie justificată și poate impune modificări adecvate. Substanța de testat se administrează prin aceeași metodă tuturor animalelor, pe durata adecvată a experimentului. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj, se utilizează o sondă gastrică. Volumul de lichid administrat o singură dată nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală (0,4 ml/100 g greutate corporală este volumul maxim pentru uleiul de porumb), cu excepția cazului soluțiilor apoase, din care se pot administra 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive, care provoacă, în mod normal, efecte exacerbate la concentrații mai ridicate, se recomandă ca variațiile volumului administrat să fie reduse la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant la toate nivelurile dozelor. În studiile efectuate prin gavaj, în mod normal puilor li se administrează substanța de testat doar în amestec cu lapte, până la începerea dozării indirecte după înțărcarea lor. În studiile în care se utilizează amestecul în hrană sau apa potabilă, puilor li se administrează substanța de testat direct din momentul în care încep să se hrănească singuri, în ultima săptămână a perioadei de alăptare.

▼B

Pentru substanțele administrate în amestec cu hrana sau apa potabilă, este important ca echilibrul nutrițional și hidric normal să nu fie afectat de cantitatea de substanță de testat administrată. Dacă substanța de testat se administrează în amestec cu hrana se poate utiliza fie o concentrație constantă în hrană (ppm), fie o doză constantă raportată la greutatea corporală a animalului; se specifică opțiunea utilizată. În cazul unei substanțe administrate prin gavaj, doza se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi și se ajustează cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant în funcție de greutatea corporală a animalului. La ajustarea în funcție de greutate a dozei administrate prin gavaj, se ține seama de informațiile privind distribuția placentară.

1.4.6. **Programe experimentale**

Administrarea zilnică a substanței de testat la femelele și masculii din generația parentală (P) începe la vârsta de 5-9 săptămâni. Administrarea zilnică a substanței de testat la femelele și masculii din generația F_1 începe la înțărcare; se ține seama de faptul că, în cazul substanțelor de testat administrate în amestec cu hrana sau apa potabilă, expunerea directă a puilor din generația F_1 la substanța de testat poate începe încă din perioada de alăptare. La ambele sexe (P și F_1), tratamentul continuă timp de cel puțin 10 săptămâni înainte de perioada de împerechere. Tratamentul continuă la ambele sexe în cele 2 săptămâni ale perioadei de împerechere. Masculii sunt eutanasiați și examinați în momentul în care nu mai sunt necesari pentru evaluarea efectelor asupra reproducerii. La femelele din generația parentală (P), tratamentul continuă pe întreaga perioadă a gestației și până la înțărcarea descendenților F_1. Se ia în considerare modificarea programului de administrare în funcție de informațiile disponibile privind substanța de testat, inclusiv date existente privind toxicitatea, inducția metabolică și bioacumulare. Doza administrată fiecărui animal se calculează, în mod normal, pe greutatea corporală individuală la ultima cântărire. Cu toate acestea, ajustarea dozelor se face cu atenție în ultimul trimestru de gestație.

Tratamentul masculilor și femelelor din generațiile P și F_1 continuă până la sacrificare. Toate animalele adulte din generațiile P și F_1, masculi și femele, sunt eutanasiate când nu mai sunt necesare pentru evaluarea efectelor asupra reproducerii. Descendenții F_1 care nu sunt selectați pentru împerechere și toți descendenții F_2 sunt eutanasiați după înțărcare.

1.4.7. **Procedura de împerechere**

1.4.7.1. *Împerecherea generației parentale (P)*

Pentru fiecare împerechere, se adăpostește fiecare femelă cu un singur mascul de la același nivel al dozei (împerechere 1:1), până când are loc copulația sau expiră un termen de 2 săptămâni. În fiecare zi, femele sunt examinate pentru a detecta prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 de gestație se definește ca ziua în care se observă spermă sau un dop vaginal. În cazurile în care împerecherea eșuează, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculi care și-au dovedit capacitatea reproductivă. Cuplurile împerecheate se identifică clar în cadrul datelor. Se evită împerecherea cosangvinilor.

▼B

1.4.7.2. *Împerecherea generației F_1*

Pentru împerecherea descendenților F_1 se selectează cel puțin un mascul și o femelă din fiecare cuib, la înțărcare, pentru împerecherea cu alți pui de la același nivel al dozei, dar din cuiburi diferite, pentru producerea generației F_2. Selecția puilor din fiecare cuib se face aleatoriu dacă nu există diferențe majore între puii din același cuib din punctul de vedere al greutății corporale și a aspectului fizic. Dacă se observă astfel de diferențe, se selectează cei mai buni reprezentanți din fiecare cuib. Pragmatic, selecția se face cel mai ușor în funcție de greutatea corporală, dar este posibil ca selecția în funcție de aspect să fie mai relevantă. Descendenții F_1 nu se împerechează înainte de a fi atins maturitatea sexuală deplină.

Cuplurile fără descendenți sunt evaluate pentru determinarea cauzei aparente a infertilității. Evaluarea include proceduri precum oportunități suplimentare de împerechere cu alți masculi sau femele care și-au dovedit capacitatea reproductivă, examinarea microscopică a organelor de reproducere și analiza ciclurilor estrale și a spermatogenezei.

1.4.7.3. *A doua împerechere*

În anumite situații, precum modificări ale dimensiunii cuibului corelate cu tratamentul sau observarea unor efecte echivoce la prima împerechere, se recomandă a doua împerechere a adulților P sau F_1, pentru a produce un al doilea cuib. Se recomandă reîmperecherea femelelor sau masculilor care nu au produs un cuib cu animale de sex opus care și-au dovedit capacitățile reproductive. Dacă se consideră necesară producerea celui de-al doilea cuib la oricare dintre generații, animalele se împerechează din nou la aproximativ o săptămână după înțărcarea cuibului anterior.

1.4.7.4. *Dimensiunea cuibului*

Animalele se lasă să fete normal și să își crească descendenții până la înțărcare. Standardizarea dimensiunii cuibului este opțională. Dacă se recurge la standardizare, se descrie detaliat metoda utilizată.

1.5. OBSERVAȚIILE

1.5.1. **Observațiile clinice**

Se efectuează zilnic un examen clinic general, iar în cazul administrării prin gavaj, planificarea examenului clinic ține seama de perioada de vârf a efectelor după administrare. Se înregistrează modificările de comportament, semnele de fătare dificilă sau prelungită și orice semne de toxicitate. Cel puțin o dată pe săptămână fiecare animal este supus unui examen mai detaliat, care se poate efectua, pentru convenință, simultan cu cântărirea animalului. De două ori pe zi sau o singură dată pe zi la sfârșitul săptămânii, dacă este cazul, fiecare animal este supus unui examen pentru stabilirea morbidității sau decesului.

▼B

1.5.2. **Greutatea corporală și consumul de hrană/apă ale animalelor părinți**

Animalele părinți (P și F_1) sunt cântărite în prima zi de tratament și, ulterior, cel puțin o dată pe săptămână. Femelele părinți (P și F_1) sunt cântărite cel puțin în zilele de gestație 0, 7, 14 și 20 sau 21, iar în perioada de alăptare în zilele în care sunt cântăriți puii și în ziua în care sunt sacrificate. Aceste observații se înregistrează individual pentru fiecare animal adult. În perioada de dinainte de împerechere și în perioada de gestație, consumul de hrană se măsoară cel puțin o dată pe săptămână. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână, dacă substanța de testat se administrează în apă.

1.5.3. **Ciclul estral**

Lungimea și normalitatea ciclului estral se evaluează la femelele P și F_1 prin frotiuri vaginale înainte de împerechere și în perioada de împerechere, opțional, până la obținerea de probe ale împerecherii. La prelevarea de celule vaginale/cervicale se evită cu atenție deteriorarea mucoaselor și, prin urmare, inducerea pseudogestației (1).

1.5.4. **Parametrii de evaluare a spermei**

La sacrificarea tuturor masculilor din generațiile P și F_1, se înregistrează greutatea testiculelor și a epididimului, păstrându-se câte un exemplar din fiecare organ pentru examenul histopatologic (a se vedea secțiunile 1.5.7, 1.5.8.1). Restul testiculelor și epididimelor de la un subgrup de cel puțin zece masculi din fiecare grup de masculi din generațiile P și F_1 se utilizează pentru numărarea spermatidelor rezistente la omogenizare și, respectiv, a rezervelor de spermatozoizi din coada epididimului. De la același subgrup de masculi se colectează spermă din coada epididimului sau din canalul deferent pentru evaluarea motilității și a morfologiei spermatozoizilor. Dacă se observă efecte corelate cu tratamentul sau dacă există dovezi din alte studii privind posibilele efecte asupra spermatogenezei, se efectuează o evaluare a spermei tuturor masculilor din grupurile tratate cu diverse niveluri ale dozei; în caz contrar, evaluarea spermei se poate restrânge la masculii din generațiile P și F_1 din grupul martor și grupul tratat cu cea mai mare doză.

Se determină numărul total de spermatide testiculare rezistente la omogenizare și numărul de spermatozoizi din coada epididimului (2) (3). Rezervele de spermatozoizi din coada epididimului se pot calcula din concentrația și volumul spermei din suspensia utilizată pentru realizarea evaluărilor calitative și numărul de spermatozoizi recuperați din mărunțirea și/sau omogenizarea ulterioară a țesutului caudal rămas. Evaluarea numerică se efectuează pe subgrupul de masculi selectați din grupurile tratate la toate nivelurile dozei imediat după sacrificarea animalelor, cu excepția cazului în care se fac înregistrări video sau digitale sau a cazului în care eșantioanele sunt înghețate și analizate ulterior. În aceste cazuri, se poate proceda mai întâi la analizarea grupurilor martor și a grupului tratat cu doza cea mai mare. Dacă nu se observă efecte corelate cu tratamentul (de exemplu, efecte asupra numărului de spermatozoizi, motilității și morfologiei spermatozoizilor), nu este necesar să se analizeze grupurile tratate cu alte doze. Dacă la grupul tratat cu doza cea mai mare se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici.

▼B

Motilitatea spermei din epididim (sau canalele deferente) se evaluează sau se înregistrează pe suport video imediat după sacrificare. Sperma se colectează astfel încât să se evite deteriorarea organelor și se diluează pentru analiza motilității utilizând metode acceptabile (4). Procentajul de spermatozoizi cu motilitate progresivă se determină subiectiv sau obiectiv. Dacă se face o analiză a mobilității asistată de computer (5) (6) (7) (8) (9) (10), calculul motilității progresive se bazează pe limite definite de utilizator pentru viteza medie pe traiectorie, rectiliniaritate și indicele liniar. Dacă eșantioanele sunt înregistrate pe suport video (11) sau se înregistrează imagini în alt mod în momentul autopsiei, analiza ulterioară poate fi restrânsă doar la masculii P și F_1 din grupul martor și grupul tratat la cea mai mare doză, cu excepția cazului în care se observă efecte corelate cu tratamentul; în acest caz, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici. În absența unei imagini video sau digitale, toate eșantioanele prelevate de la toate grupurile de tratament se analizează în momentul autopsiei.

Se efectuează o evaluare morfologică a unui eșantion de spermă colectat din epididim (sau canalul deferent). Spermatozoizii (cel puțin 200 per eșantion) se examinează ca preparate fixe, lichide (12) și clasificați ca normali sau anormali. Printre anomaliile morfologice ale spermatozoizilor se numără fuziunea, capete izolate și capete și/sau cozi malformate. Evaluarea vizează subgrupul selectat de masculi din toate grupurile tratate cu diverse doze și se efectuează fie imediat după sacrificare, fie ulterior, pe baza înregistrărilor video sau digitale. Odată fixate, frotiurile pot fi citite ulterior. În aceste cazuri, se poate proceda mai întâi la analizarea grupurilor martor și a grupului tratat cu doza cea mai mare. Dacă nu se observă efecte corelate cu tratamentul (de exemplu, efecte asupra morfologiei spermatozoizilor), nu este necesar să se analizeze grupurile tratate cu alte doze. Dacă la grupul tratat cu doza cea mai mare se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează și grupurile tratate cu doze mai mici.

Dacă oricare dintre parametrii de evaluare a spermei menționați anterior a fost analizat în cadrul unui studiu de toxicitate sistemică de cel puțin 90 de zile, nu este obligatoriu ca acesta să fie reevaluat în cadrul studiului pe două generații. Cu toate acestea, se recomandă păstrarea de eșantioane sau înregistrări digitale ale spermei din generația P, pentru a permite efectuarea unor evaluări ulterioare, dacă este cazul.

1.5.5. **Descendenți**

Se examinează fiecare cuib, cât mai curând posibil după fătare (ziua de alăptare 0) pentru stabilirea numărului de pui și a sexului acestora, a numărului de pui fătați morți, a numărului de pui vii și a prezenței unor anomalii macroscopice. Este de preferat ca puii găsiți morți în ziua 0, dacă nu sunt macerați, să fie examinați pentru detectarea posibilelor anomalii și determinarea cauzei morții și conservați. Puii vii se numără și se cântăresc individual, la naștere (ziua de alăptare 0) sau în ziua 1 și, ulterior, în zilele normale de cântărire, de exemplu, în zilele 4, 7, 14 și 21 de alăptare. Se înregistrează orice anormalități fizice sau comportamentale observate la femele sau descendenți.

▼B

Se urmărește dezvoltarea fizică a descendenților, în special prin creșterea greutății corporale. Alți parametri fizici (de exemplu, deschiderea urechilor și a ochilor, erupția dinților, creșterea blănii) pot oferi informații suplimentare, dar aceste date se evaluează, de preferință, în contextul datelor privind maturitatea sexuală (de exemplu, vârsta și greutatea corporală la deschiderea vaginului sau separarea balano-prepuțială) (13). Se recomandă efectuarea unor investigații funcționale (de exemplu, activitatea motorie, funcțiile senzoriale, ontogeneza reflexelor) asupra descendenților F_1 înainte și/sau după înțărcare, în special a celor legate de maturizarea sexuală, dacă astfel de investigații nu sunt incluse în studii separate. La puii înțărcați din generația F_1 selectați pentru împerechere se determină vârsta la care survine deschiderea vaginului sau separarea prepuțială. În ziua 0 după fătare se măsoară distanța ano-genitală la puii din generația F_2, dacă se constantă modificări ale proporției de masculi și femele sau ale momentului maturizării sexuale la generația F_1.

Se pot omite observațiile funcționale la grupurile care prezintă semne clare ale unor efecte adverse (de exemplu, o scădere semnificativă a greutății corporale etc.). Dacă se efectuează investigații funcționale, acestea nu se efectuează asupra puilor selectați pentru împerechere.

1.5.6. **Autopsia**

În momentul sacrificării sau al decesului în cursul studiului, toate animalele din generațiile parentale (P și F_1), toți puii care prezintă anormalități externe sau semne clinice, precum și câte un pui/sex/cuib selectat aleatoriu din generațiile F_1 și F_2 sunt supuși unei autopsii pentru determinarea anomaliilor structurale sau a modificărilor patologice. Se acordă o atenție specială organelor sistemului de reproducere. Puii care sunt eutanasiați în stare muribundă sau puii decedați, dacă nu sunt macerați, sunt examinați pentru determinarea posibilelor defecte și/sau a cauzei decesului și conservați.

Se examinează uterele tuturor femelelor primipare, astfel încât să nu se compromită examenul histopatologic, pentru determinarea prezenței și a numărului de locuri de implantare.

1.5.7. **Greutatea organelor**

În momentul sacrificării, se stabilește greutatea corporală și greutatea următoarelor organe ale tuturor animalelor din generațiile parentale P și F_1 (organele pereche se cântăresc individual):

— uter, ovare;

— testicule, epididime (greutate totală și greutatea cozii);

— prostată;

— vezicule seminale cu glande coagulante și fluidele lor și prostată (împreună);

— creier, ficat, rinichi, splină, glandele pituitare, tiroidă și suprarenale, precum și organele țintă cunoscute.

Se stabilește greutatea corporală la sacrificare a puilor din generațiile F_1 și F_2 selectați pentru autopsie. Se cântăresc următoarele organe ale puiului/sexului/cuibului selectat aleatoriu (a se vedea punctul 1.5.6): creier, splină și timus.

▼B

Dacă este posibil, rezultatele autopsiei macroscopice și greutatea organelor se analizează în corelație cu observațiile altor studii cu doze repetate.

1.5.8. **Histopatologie**

1.5.8.1. *Animale din generațiile parentale*

Se fixează și se conversă într-un mediu adecvat pentru examenul histopatologic următoarele organe și țesuturi ale animalelor din generațiile parentale (P și F_1) sau eșantioane reprezentative ale acestora.

— vagin, uter cu cervix și ovare (conservate într-un fixativ adecvat);

— un testicul (conservat în fixator Bouin sau fixator analog), un epididim, vezicule seminale, prostată și glanda coagulantă;

— organul sau organele țintă identificate anterior de la toate animalele P și F_1 selectate pentru împerechere.

Se efectuează un examen histopatologic complet asupra organelor și țesuturilor conservate enumerate anterior de la toate animalele P și F_1 selectate pentru împerechere din grupul martor și grupul tratat cu cea mai mare doză. Examinarea ovarelor animalelor P este opțională. Se examinează, de asemenea, organele care prezintă modificări corelate cu tratamentul de la grupurile tratate cu doza cea mai mică și cu o doză intermediară, pentru a facilita determinarea NOAEL. În plus, se efectuează un examen histopatologic asupra organelor de reproducere ale animalelor tratate cu doza cea mai mică și o doză intermediară care sunt suspectate de fertilitate scăzută, de exemplu, cele care nu s-au împerecheat, nu au conceput, nu au generat sau nu au fătat descendenți sănătoși sau la care au fost afectate ciclul estral sau numărul, motilitatea sau morfologia spermatozoizilor. Se examinează toate leziunile macroscopice, precum atrofia sau tumorile.

Se efectuează un examen histopatologic detaliat al testiculelor (utilizând, de exemplu, fixator Bouin, încapsulare în parafină și secțiuni transversale de 4-5 μm grosime), pentru a identifica efectele corelate cu tratamentul, precum retenția de spermatide, straturi sau tipuri de celule germinale absente, celule multinucleate gigant sau inserția celulelor spermatogene în lumen (14). Examinarea epididimului intact vizează capul, corpul și coada și se poate realiza prin examinarea unei secțiuni longitudinale. Se examinează epididimul pentru detectarea infiltrației de leucocite, modificarea tipurilor de celule preponderente, tipuri de celule aberante și fagocitoza spermatozoizilor. Pentru examinarea organelor masculine de reproducere se poate utiliza colorarea cu periodic acid Schiff (PAS) și hematoxilină.

În perioada de după alăptare, ovarul trebuie să conțină foliculi primordiali și foliculi în creștere, precum și marile corpuri galbene ale lactației. Examenul histopatologic relevă o scădere calitativă a populației de foliculi primordiali. Se efectuează o analiză cantitativă a foliculilor primordiali la femelele F_1; numărul de animale, selectarea secțiunii ovariene și dimensiunea eșantionului de secțiuni trebuie să corespundă din punct de vedere statistic procedurii de evaluare utilizate. Examenul include numărarea foliculilor primordiali, care pot fi amestecați cu foliculi mici în creștere, pentru compararea uterelor tratate cu uterele martor (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Pui înțărcați*

Se fixează și se conservă într-un mediu adecvat pentru examenul histopatologic țesuturile care prezintă anormalități macroscopice și organele țintă de la toți puii care prezintă anomalii externe sau semne clinice, precum și de la puiul/sexul/cuibul selectat aleatoriu din generațiile F_1 și F_2 care nu au fost selectați pentru împerechere. Se face o descriere histopatologică a țesuturilor conservate, acordându-se o atenție specială organelor sistemului de reproducere.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Datele se prezintă individual și sub forma unui rezumat tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de tratament și fiecare generație, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de observații asupra animalelor parentale și descendenților, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind cuiburile.

Datele numerice se evaluează printr-o metodă statistică adecvată, general acceptată; metodele statistice se selectează în etapa de concepere a studiului și se justifică. Modelele statistice doză-reacții pot fi utile pentru analiza datelor. Raportul trebuie să includă informații suficiente privind metoda de analiză și programul computerizat utilizate pentru ca un revizor/statistician independent să poată reevalua și reface analiza.

2.2. EVALUAREA REZULTATELOR

Rezultatele acestui studiu de toxicitate asupra reproducerii pe două generații se evaluează în funcție de efectele observate, inclusiv rezultatele autopsiei și ale examenului microscopic. Evaluarea include relația sau absența unei relații între doza de substanță de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra producerii și asupra performanțelor descendenților, modificări ale greutății corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice. La evaluarea rezultatelor se iau în considerare proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat și, dacă sunt disponibile, date privind toxicocinetica.

Un test de toxicitate efectuat corespunzător generează o estimare satisfăcătoare a nivelului la care nu se observă efecte și permite înțelegerea efectelor adverse asupra reproducerii, fătării, alăptării și dezvoltării postnatale, inclusiv asupra creșterii și dezvoltării sexuale.

▼B

2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Un studiu de toxicitate asupra reproducerii pe două generații furnizează informații privind efectele expunerii repetate la o substanță în toate etapele ciclului de reproducere. Studiul furnizează în special informații privind parametrii reproducerii și asupra dezvoltării, creșterii, maturizării și supraviețuirii descendenților. Rezultatele studiului se interpretează în strânsă legătură cu rezultatele studiilor de toxicitate subcronică, de toxicitate asupra dezvoltării intrauterine, de toxicocinetică și ale altor studii disponibile. Rezultatele acestui studiu pot fi utilizate pentru a se determina necesitatea efectuării altor teste asupra unei substanțe. Extrapolarea rezultatelor studiului la om este valabilă într-o măsură restrânsă. Rezultatele studiului sunt mai utile pentru a furniza informații privind nivelurile fără efecte adverse și nivelul admisibil de expunere umană (20) (21) (22) (23).

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare include următoarele informații:

Substanța de testat:

— natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare;

— puritate.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea vehiculului ales, în cazul unui vehicul altul decât apa.

Animalele de experiență:

— specie/sușă utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursă, condiții de adăpostire, hrană, materiale pentru construirea cuibului etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutului testului.

Condiții de testare:

— motivație pentru nivelul selectat al dozei;

— detalii privind formula/includerea în hrană a substanței de testat, concentrația obținută;

— stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței de testat;

— transformarea concentrației de substanță de testat în hrană/apa potabilă (ppm) în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

▼B

Rezultate:

— consumul de hrană și consumul de apă, dacă este disponibil, eficiența hranei (creștere a greutății corporale per gram de hrană consumată) și consumul de material testat la animalele P și F_1, exceptând perioada de coabitare și cel puțin ultima treime a perioadei de alăptare;

— date privind absorbția (dacă sunt disponibile);

— date privind greutatea corporală a animalelor P și F_1 selectate pentru împerechere;

— date privind greutatea cuibului și a puilor;

— greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea absolută și relativă a organelor la animalele parentale;

— natura, gravitatea și durata semnelor clinice (dacă sunt reversibile sau nu);

— data decesului în cursul studiului sau date privind animalele care au supraviețuit până la sacrificare;

— date privind reacția toxică în funcție de sex și doză, inclusiv indici de împerechere, fertilitate, gestație, fătare, viabilitate și alăptare; raportul prezintă cifrele utilizate pentru calcularea indicilor;

— efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, descendenților, creșterii postnatale etc.;

— concluziile autopsiei;

— o descriere detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— numărul de femele P și F_1 cu ciclul normal și durata ciclului;

— numărul total de spermatozoizi în coada epididimului, procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă, procentajul de spermatozoizi normali din punct de vedere morfologic și procentajul de spermatozoizi pentru fiecare anomalie identificată;

— perioada până la împerechere, inclusiv numărul de zile până la împerechere;

— durata gestației;

— numărul de implantări, corpuri galbene, dimensiunea cuiburilor;

— numărul de pui născuți vii și pierderi după implantare;

— numărul de pui cu anomalii macroscopice, numărul de pui mai mici decât normal, dacă se determină;

— date privind reperele fizice la pui și alte date privind dezvoltarea postnatală; reperele fizice evaluate se justifică;

— date privind investigațiile funcționale la pui și adulți, după caz;

— prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

▼B

Discutarea rezultatelor.

Concluzii, inclusiv valorile NOAEL pentru efectele asupra femelelor gestante și descendenți.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Sadleir, R. M. F. S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals*: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2. Gray, L. E. *et al.*, (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12; 92-108.

3. Robb, G. W. *et al.*, (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54; 103-107.

4. Klinefelter, G. R. *et al.*, (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5; 39-44

5. Seed, J. *et al.* (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3); 237- 244.

6. Chapin, R. E. *et al.*, (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6; 267-273

7. Klinefelter, G. R. *et al.*, (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

8. Slott, V. L. *et al.*, (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

9. Slott, V. L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.

10. Toth, G. P. *et al.* (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10:401-415.

11. Working, P. K. and M. Hurtt, (1987). Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

12. Linder, R. E. *et al.*, (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

13. Korenbrot, C. C. *et al.*, (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17; 298-303.

14. Russell, L. D. *et al.*, (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15. Heindel, J. J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16. Heindel, J. J. *et al.*, (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

17. Manson, J. M. and Y. J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

18. Smith, B. J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5; 379-383.

19. Heindel, J. J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C. A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20. Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C. D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21. Zenick, H. and E. D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A. W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22. Palmer, A. K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C. A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23. Palmer, A. K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J. G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOCINETICĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 417 (2010) a OCDE. Studiile care evaluează toxicocinetica unei substanțe au ca scop să obțină informații adecvate privind absorbția, distribuția, biotransformarea (adică metabolismul) și excreția acesteia, să ajute la stabilirea unei relații între concentrație sau doză și toxicitatea observată și să ajute la înțelegerea mecanismului toxicității. Toxicocinetica poate contribui la înțelegerea studiilor toxicologice prin demonstrarea faptului că animalele utilizate în scopuri experimentale sunt expuse în mod sistematic la substanța chimică testată și prin identificarea fracțiilor circulante (substanță chimică de origine/metaboliți). Parametrii toxicocinetici de bază determinați în urma acestor studii vor furniza, de asemenea, informații privind potențialul de acumulare a substanței chimice testate în țesuturi și/sau organe și potențialul de declanșare a biotransformării ca urmare a expunerii la aceasta.

2. Datele toxicocinetice pot contribui la evaluarea adecvării și relevanței datelor de toxicitate animală în scopul extrapolării pericolelor pentru om și/sau a evaluării riscurilor. În plus, studiile toxicocinetice pot oferi informații utile privind stabilirea nivelurilor dozelor pentru studiile de toxicitate (cinetică liniară și neliniară), efectele asociate căilor de administrare, biodisponibilitatea și aspecte legate de proiectul studiului. Anumite tipuri de date toxicocinetice pot fi utilizate pentru elaborarea de modele toxicocinetice fiziologice.

3. Datele privind metabolismul/toxicocinetica au utilizări importante, cum ar fi sugerarea posibilelor toxicități și a modurilor de acțiune și a relațiilor dintre acestea și nivelul dozei și calea de expunere. În plus, datele privind metabolismul pot oferi informații utile pentru evaluarea importanței toxicologice a expunerilor la metaboliți exogeni ai substanței chimice testate.

4. Datele toxicocinetice adecvate vor fi utile în susținerea suplimentară a acceptabilității și a aplicabilității relațiilor cantitative structură-activitate, a metodelor de extrapolare sau a grupării în evaluarea siguranței substanțelor chimice. Datele cinetice mai pot fi utilizate pentru evaluarea relevanței toxicologice a altor studii (de exemplu, studii *in vivo/in vitro*).

5. Dacă nu sunt menționate alte căi de administrare (a se vedea în special punctele 74-78), această metodă de testare se aplică administrării orale a substanței chimice testate.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

6. Sistemele de reglementare conțin cerințe și necesități diferite în ceea ce privește măsurarea efectelor și a parametrilor toxicocinetici ai diferitelor clase de substanțe chimice (de exemplu, pesticide, biocide, substanțe chimice industriale). Spre deosebire de majoritatea metodelor de testare, aceasta metodă descrie testarea toxicocinetică, care presupune măsurători și efecte multiple. În viitor pot fi dezvoltate metode de testare și/sau documente de orientare noi pentru a descrie fiecare efect în parte și în detaliu. În cazul acestei metode de testare, testele sau evaluările efectuate sunt specificate de către fiecare dintre cerințele și/sau sistemele de reglementare.

▼M4

7. Există numeroase studii ce pot fi realizate pentru a evalua comportamentul toxicocinetic al unei substanțe chimice testate în scopuri de reglementare. Totuși, în funcție de necesități și de situațiile de reglementare specifice, este posibil să nu fie necesare toate aceste studii pentru evaluarea unei substanțe chimice testate. În proiectarea studiilor toxicocinetice este nevoie de flexibilitate, pentru a se ține cont de caracteristicile substanței chimice testate care face obiectul investigațiilor. În unele cazuri, este necesară numai studierea unui anumit de set de elemente pentru abordarea motivelor de îngrijorare privind pericolele și riscurile asociate substanței chimice testate. În unele situații, datele toxicocinetice pot fi colectate ca parte a evaluării din alte studii toxicologice. În alte situații pot fi necesare studii toxicocinetice suplimentare și/sau mai complexe, în funcție de necesitățile de reglementare și/sau dacă apar noi elemente în cursul evaluării substanței chimice testate.

8. Laboratorul de testare ar trebui să țină cont de toate informațiile disponibile referitoare la substanța chimică testată, la metaboliții și la analogii relevanți înainte de efectuarea studiului, în vederea creșterii calității acestuia și pentru a evita utilizarea inutilă a animalelor. Aceste informații ar putea include date obținute prin alte metode de testare relevante (studii *in vivo/in vitro* și/sau evaluări *in silico*). Proprietățile fizico-chimice, cum sunt coeficientul de partiție octanol/apă (exprimat ca log $P_{OW)}$, pKa, solubilitatea în apă, presiunea de vapori și greutatea moleculară a unei substanțe chimice, pot fi utile în planificarea studiului și interpretarea rezultatelor. Acestea pot fi determinate prin metode adecvate, astfel cum sunt descrise în metodele de testare relevante.

LIMITĂRI

9. Această metodă de testare nu poate fi aplicată în situații speciale, cum ar fi la animale gestante sau care alăptează și la pui de animale sau pentru evaluarea eventualelor reziduuri din animalele destinate producției de alimente care au fost expuse. Totuși, datele obținute în urma unui studiu conform capitolului B.36 pot oferi informații de referință, utile în proiectarea unor studii specifice pentru aceste investigații. Această metodă nu este destinată testării nanomaterialelor. Un raport privind revizuirea preliminară a aplicabilității orientărilor OCDE la nanomateriale indică faptul că Orientarea 417 (echivalentă metodei de testare B. 36) nu se aplică acestora (1).

DEFINIȚII

10. Definițiile utilizate în scopurile acestei metode de testare sunt furnizate în apendice.

CONSIDERAȚII REFERITOARE LA BUNĂSTAREA ANIMALELOR

11. Orientări privind tratamentul uman al animalelor sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 19 (2). Se recomandă consultarea Ghidului OCDE nr. 19 pentru toate studiile *in vivo* și *in vitro* descrise în această metodă de testare.

DESCRIEREA METODELOR

Studii pilot

12. Utilizarea studiilor pilot este recomandată și încurajată pentru selectarea parametrilor experimentali ai studiilor de toxicocinetică (de exemplu, metabolism, bilanț masic, proceduri analitice, determinarea dozei, expirația CO_2 etc.). Caracterizarea unora dintre acești parametri poate să nu necesite utilizarea de substanțe chimice marcate radioactiv.

▼M4

Selectarea animalelor

Specia

13. Specia (și sușa) animalelor utilizate pentru testele toxicocinetice ar trebui, de preferință, să fie identice cu cele utilizate în alte studii toxicologice efectuate pe substanța chimică studiată. Animalul recomandat este șobolanul, acesta fiind cel mai frecvent utilizat în studiile toxicologice. Utilizarea altor specii sau a unor specii suplimentare poate fi justificată atunci când studiile toxicologice critice identifică urme importante de toxicitate la astfel de specii sau dacă se constată că toxicitatea/toxicocinetica acestora prezintă o relevanță mai mare pentru om. Selectarea speciei de animale și a sușei acesteia ar trebui justificată.

14. Dacă nu se specifică altfel, specia utilizată pentru această metodă de testare este șobolanul. Este posibil ca anumite aspecte ale acestei metode de testare să trebuiască a fi modificate pentru folosirea altor specii utilizate în scopuri experimentale.

Vârsta și sușa

15. Ar trebui utilizate animale adulte sănătoase, tinere (de obicei având 6-12 săptămâni la momentul administrării dozei) (a se vedea, de asemenea, punctele 13 și 14). Utilizarea altor animale în afara celor adulte tinere ar trebui să fie justificată. Toate animalele ar trebui să aibă aceeași vârstă la începutul studiului. Diferența de greutate între animale nu ar trebui să depășească ± 20 % din greutatea medie a grupului de test. În mod ideal, sușa utilizată ar trebui să fie identică cu cea utilizată pentru obținerea bazei de date toxicologice privind substanța chimică testată.

Numărul și sexul animalelor

16. Pentru fiecare doză testată ar trebui să se utilizeze cel puțin patru animale de același sex. Ar trebui prezentată o justificare pentru sexul animalelor utilizate. Ar trebui avută în vedere utilizarea animalelor de ambele sexe (patru masculi și patru femele) atunci când există indicii privind diferențe semnificative de toxicitate în legătură cu sexul.

Condiții de adăpostire și de hrănire

17. În general, animalele ar trebui adăpostite în incinte individuale pe durata perioadei de testare. Adăpostirea în grupuri poate fi justificată doar în cazuri speciale. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Temperatura și umiditatea relativă a sălii în care se află animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °C), iar umiditatea relativă de 30-70 %. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut.

Substanța chimică testată

18. Pentru toate aspectele studiului care se referă la bilanțul masic și la identificarea metaboliților ar trebui utilizată o substanță chimică marcată radioactiv cu ^{14}C; totuși, dacă se poate demonstra că:

— bilanțul masic și identificarea metaboliților pot fi evaluate în mod adecvat utilizând o substanță chimică testată nemarcată;

— specificitatea și sensibilitatea analitică a metodei utilizate cu substanța chimică testată nemarcată radioactiv sunt egale sau mai mari decât cele care ar putea fi obținute prin marcarea radioactivă a acesteia,

▼M4

atunci nu este necesară utilizarea unei substanțe chimice testate marcate radioactiv. În plus, pot fi utilizați alți izotopi radioactivi și stabili, în special dacă elementul determină toxicitatea sau dacă face parte din porțiunea toxică a substanței chimice testate. Dacă este posibil, marcajul radioactiv ar trebui localizat în porțiunea centrală a moleculei stabile din punct de vedere metabolic (nu poate fi înlocuită, nu este eliminată prin metabolism sub formă de CO_2 și nu este inclusă ansamblul radicalilor un atom de carbon din organism). Este posibil să fie necesară marcarea mai multor porțiuni sau zone specifice ale moleculei pentru a urmări soarta metabolică a substanței chimice testate.

19. Substanțele testate marcate și nemarcate radioactiv ar trebui să fie analizate folosind metode adecvate de stabilire a purității și identității. Puritatea radiochimică a substanței chimice testate marcate radioactiv ar trebui să fie cea mai înaltă posibilă pentru o anumită substanță chimică testată (în mod ideal, peste 95 %) și ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru a identifica impuritățile prezente în procent mai mare sau egal cu 2 %. Puritatea, împreună cu identitatea și proporția impurităților identificate ar trebui să fie raportate. Anumite programe de reglementare pot alege să ofere orientări suplimentare pentru a ajuta la definirea și la specificarea substanțelor testate formate din amestecuri și a metodelor de determinare a purității.

Alegerea dozei

Studiul pilot

20. De obicei, pentru studiul pilot este suficientă o doză orală unică. Doza nu ar trebui să fie toxică, însă ar trebui să fie suficient de mare pentru a permite identificarea metaboliților în excremente (și, după caz, în plasmă) și pentru a atinge obiectivul declarat al studiului pilot, astfel cum se menționează la punctul 12 al acestei metode de testare.

Studiile principale

21. Numărul preferat de doze pentru studiile principale este de cel puțin două, deoarece informațiile colectate de la cel puțin două grupuri de doză pot fi utile la stabilirea dozelor în alte studii de toxicitate și pentru evaluarea relației doză-răspuns din testele de toxicitate existente.

22. Atunci când se administrează două niveluri de doze, ambele ar trebui să fie suficient de mari pentru a permite identificarea metaboliților în excreții (și, după caz, în plasmă). Stabilirea dozei ar trebui să țină cont de informațiile obținute din datele de toxicitate disponibile. Dacă nu sunt disponibile informații (obținute, de exemplu, din studiile de toxicitate orală acută care înregistrează semnele clinice de toxicitate sau din studiile de toxicitate cu doză repetată), poate fi avută în vedere o valoare pentru doza mai mare situată sub valoarea estimată pentru DL_{50} (căile orală și cutanată) sau pentru CL_{50} (calea de administrare prin inhalare) sau sub valoarea cea mică estimată pentru intervalul de toxicitate acută. Doza mai mică ar trebui să fie o fracțiune din doza mai mare.

23. Dacă este investigat un singur nivel de doză, aceasta ar trebui să fie, în condiții ideale, suficient de mare pentru a permite identificarea metaboliților în excreții (și, după caz, în plasmă), fără a produce toxicitate vizibilă. Motivul neintroducerii unei a doua doze ar trebui să fie justificat.

24. Dacă este necesară stabilirea efectului dozei asupra proceselor cinetice, este posibil ca două doze să nu fie suficiente și ar trebui ca cel puțin o doză să fie suficient de mare pentru a satura aceste procese. În cazul în care zona de sub curba concentrație plasmatică în funcție de timp (ASC) nu este liniară între cele două niveluri de doză utilizate în studiul principal, acesta este un indiciu clar că între cele două niveluri de doză are loc saturarea a unuia sau mai multor procese cinetice.

▼M4

25. Doza maximă care ar trebui utilizată pentru substanțele chimice testate cu toxicitate redusă este de 1 000 mg/kg greutate corporală (căile orală și cutanată) – dacă administrarea se face prin inhalare, pentru orientare consultați capitolul B.2 din prezenta anexă; în mod normal, această doză nu ar trebui să depășească 2 mg/l. Anumite considerații de specifice substanței chimice pot impune utilizarea unei doze mai mari, în funcție de necesitățile de reglementare. Alegerea dozei ar trebui să fie întotdeauna justificată.

26. Datele toxicocinetice și de distribuție tisulară pentru doza unică pot fi suficiente pentru a determina potențialul de acumulare și/sau de persistență. Totuși, în anumite cazuri, poate fi necesară administrarea de doze repetate: (i) pentru o mai bună identificare a potențialului de acumulare și/sau de persistență sau a modificărilor toxicocinetice (de exemplu, inducția și inhibarea enzimelor); sau (ii) întrucât este impus de sistemul de reglementare în vigoare. În studiile cu doze repetate, deși administrarea dozei mici este, de obicei, suficientă, în anumite circumstanțe poate fi necesară administrarea repetată a unei doze mari (a se vedea, de asemenea, punctul 57).

Administrarea substanței chimice testate

27. Substanța chimică testată ar trebui să fie dizolvată sau trecută în suspensie omogenă în același vehicul utilizat pentru celelalte studii de toxicitate cu administrare prin gavaj oral, dacă informațiile privind acest vehicul sunt cunoscute. Alegerea vehiculului ar trebui să fie justificată. Alegerea vehiculului și volumul de dozare ar trebui avute în vedere în proiectul studiului. Metoda cea mai obișnuită de administrare este prin gavaj; cu toate acestea, în anumite situații poate fi utilă administrarea prin capsule din gelatină sau prin amestecarea în hrană (în ambele cazuri, soluția folosită ar trebui justificată). Ar trebui verificată doza efectivă administrată fiecărui animal.

28. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată prin gavaj oral depinde de dimensiunea animalelor utilizate în scopuri experimentale, tipul vehiculului în care este introdusă doza și dacă animalul este hrănit sau nu înainte de administrarea substanței chimice testate. Motivele pentru hrănire sau limitarea acesteia înainte de administrarea dozei ar trebui să fie explicate. În mod normal, volumul ar trebui menținut la un nivel cât mai redus posibil atât pentru vehiculele apoase, cât și pentru cele neapoase. De regulă, volumul dozelor nu ar trebui să depășească 10 ml/kg greutate corporală la rozătoare. Volumele vehiculelor utilizate pentru substanțele chimice testate mai lipofile pot începe de la 4 ml/kg greutate corporală. Atunci când dozele sunt repetate, caz în care privarea zilnică de hrană ar fi contraindicată, ar trebui avute în vedere volume mai mici (de exemplu, 2-4 ml/kg greutate corporală). Dacă este posibil, va fi avută în vedere utilizarea unui volum al dozei în concordanță cu cele utilizate pentru substanța chimică testată în alte studii cu administrare prin gavaj oral.

29. Biodisponibilitatea sau absorbția orală relativă pot fi stabilite cu ajutorul administrării intravenoase (IV) a substanței chimice testate și a măsurării nivelului substanței chimice testate în sânge și/sau în excreții. Pentru studiul IV, se administrează o doză unică (de obicei echivalentă, însă fără a depăși doza orală mai mică – a se vedea selecția dozei) de substanță chimică testată, într-un vehicul adecvat. Acest material ar trebui să fie administrat într-un volum adecvat (de exemplu, 1 ml/kg greutate corporală), la locul selectat pentru administrare, la cel puțin patru animale de sex corespunzător (dacă se justifică, pot fi utilizate ambele sexe, a se vedea punctul 16). Pentru administrarea IV a substanței chimice testate este necesară prepararea unei doze complet dizolvate sau în suspensie. Vehiculul pentru administrarea IV nu ar trebui să interfereze cu integritatea sângelui sau fluxul sangvin. Dacă substanța chimică testată este administrată prin perfuzie, viteza perfuziei ar trebui să fie raportată și standardizată pentru toate animale, cu condiția utilizării unei pompe de perfuzie. Animalul ar trebui anesteziat atunci când se canulează vena jugulară (pentru administrarea substanței chimice testate și/sau prelevarea de sânge) sau când este utilizată artera

▼M4

femurală pentru administrare. Ar trebui să se acorde atenție tipului de anestezie folosit, deoarece poate avea efecte asupra toxicocineticii. Animalele ar trebui lăsate să își revină la starea normală înainte de administrarea substanței chimice testate și a vehiculului.

30. Pentru anumite substanțe chimice testate pot fi utilizate alte căi de administrare, cum sunt cea cutanată și cea prin inhalare (a se vedea punctele 74-78), în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora și de utilizarea sau expunerea umană preconizată.

Măsurări

Bilanțul masic

31. Bilanțul masic se calculează prin însumarea procentului dozei (radioactive) administrate care a fost excretat în urină, fecale și aerul expirat, cu procentul corespunzător prezent în țesuturi, în carcasa rămasă și în reziduurile colectate la spălarea cuștii (a se vedea punctul 46). În general, se consideră adecvată orice recuperare a substanței chimice testate (radioactivitate) administrate în procent de peste 90 %.

Absorbția

32. O primă estimare a absorbției poate fi obținută prin scăderea din valoarea bilanțului masic a procentului dozei prezente în tractul gastrointestinal (GI) și/sau în fecale. Pentru calculul procentului de absorbție, a se vedea punctul 33. Pentru investigarea excrețiilor, a se vedea punctele 44-49. Dacă gradul de absorbție după administrarea dozei orale nu poate fi calculat cu precizie pe baza studiilor de bilanț masic (de exemplu, atunci când în fecale este prezentă peste 20 % din doza administrată), pot fi necesare investigații suplimentare. Aceste studii ar putea include: 1. administrarea orală a substanței chimice testate și măsurarea substanței chimice testate în bilă; sau 2. administrarea orală și IV a substanței chimice testate și măsurarea substanței chimice testate nete prezente în urină, aerul expirat și carcasă pentru fiecare din cele două căi de administrare. În oricare dintre proiectele studiilor, radioactivitatea se măsoară ca metodă alternativă pentru analiza chimică specifică a substanței chimice testate și a metaboliților.

33. În cazul în care se efectuează un studiu al excreției biliare, calea de administrare cel mai frecvent utilizată este cea orală. În acest studiu, substanța chimică testată se administrează într-o doză unică, prin canularea căilor biliare la cel puțin patru animale de sex corespunzător (sau de ambele sexe, dacă se justifică). După administrarea substanței chimice testate, excreția radioactivității/substanței chimice testate în bilă ar trebui urmărită atât timp cât este necesar pentru a estima procentul din doza administrată care a fost excretat pe această cale, care poate fi utilizat apoi pentru a calcula în mod direct gradul de absorbție orală, după cum urmează:

$$\text{Procentul de absorbție} = \frac{(\text{cantitatea din bilă} + \text{urină} + \text{aerul expirat} + \text{carcasă fără conținutul din tractul GI})}{\text{cantitatea administrată}} \times 100.$$

34. La unele clase de substanțe chimice testate, secreția directă a dozei absorbite poate avea loc prin membranele intestinale. În astfel de cazuri, măsurarea procentului dozei în fecale după administrarea unei doze orale la șobolanul cu căile biliare canulate nu este considerată reprezentativă pentru doza neabsorbită. În cazul în care se presupune că are loc o secreție intestinală, se recomandă ca procentul dozei absorbite să se bazeze pe absorbția calculată prin compararea excreției după administrare pe cale orală și cea pe cale IV (la șobolanul cu și fără căile biliare canulate) (a se vedea punctul 35). Dacă se consideră necesară cuantificarea secreției intestinale, se recomandă, de asemenea, măsurarea excreției după administrarea dozei IV la șobolanul cu căile biliare canulate.

▼M4

Biodisponibilitatea

35. Biodisponibilitatea poate fi calculată pe baza cineticii plasmatice/sangvine la grupurile cu administrare orală și IV descrise la punctele 50-52, prin analiza chimică specifică a substanței chimice testate și/sau a metabolitului (metaboliților) relevant (relevanți), prin urmare nefiind necesară marcarea radioactivă a substanței chimice testate. Biodisponibilitatea (F) substanței chimice testate sau a metabolitului (metaboliților) relevant (relevanți) poate fi calculată după cum urmează:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Doză_{IV}/Doză_{exp})$$

unde ASC este zona de sub curba concentrației plasmatice în funcție de timp, iar exp este calea de administrare experimentală (orală, cutanată sau prin inhalare).

36. Pentru evaluarea riscurilor efectelor sistemice, biodisponibilitatea componentei toxice este în general preferată procentului de absorbție atunci când concentrațiile sistemice ale studiilor la animale sunt comparate cu datele analoge de biomonitorizare ale studiilor privind expunerea muncitorilor. Situația poate deveni mai complicată atunci când dozele se află în intervalul neliniar, astfel încât este important ca procedura de screening toxicocinetic să determine dozele din intervalul liniar.

Distribuția tisulară

37. Cunoașterea distribuției tisulare a unei substanțe chimice testate și/sau a metaboliților acesteia este importantă atât pentru identificarea țesuturilor țintă și înțelegerea mecanismelor de toxicitate subiacente, cât și pentru obținerea de informații privind potențialul de acumulare și de persistență al substanței chimice testate și al metaboliților. Procentul dozei totale (radioactive) din țesuturi și din carcasa reziduală ar trebui să fie măsurat cel puțin la încheierea experimentului de excreție (de obicei, într-un interval de cel mult 7 zile după administrarea dozei, în funcție de comportamentul specific al substanței chimice testate). Dacă la încheierea studiului nu este detectată nicio urmă a substanței chimice testate în țesuturi (de exemplu, deoarece substanța chimică testată a fost eliminată înainte de încheierea studiului ca urmare a unui timp scurt de înjumătățire), ar trebui să se acorde atenție evitării erorilor de interpretare a datelor. Într-o astfel de situație, distribuția tisulară ar trebui investigată la momentul concentrației plasmatice/sangvine maxime (T_{max}) a substanței chimice testate (și/sau a metaboliților) sau la rata maximă a excreției urinare, după caz (a se vedea punctul 38). În plus, prelevarea de țesuturi poate fi necesară și la alte momente, pentru a se determina distribuția tisulară a substanței chimice testate și/sau a metaboliților săi, pentru a evalua dependența de timp (dacă este necesar), pentru a ajuta la calculul bilanțului masic și/sau la solicitarea unei autorități competente. Țesuturile care ar trebui prelevate includ țesuturi hepatice, adipoase, de la nivelul tractului GI, renale sau splenice, sânge integral, țesuturi din carcasa reziduală, din organele țintă și orice alte țesuturi [de exemplu, din glanda tiroidă, eritrocite, din organele reproductive, piele, din ochi (în special la animalele pigmentate)] care pot prezenta interes în evaluarea toxicologică a substanței chimice testate. Ar trebui avută în vedere analiza țesuturilor suplimentare la aceleași momente, în scopul unei utilizări mai eficiente a animalelor și în cazul în care se observă toxicitate la organul țintă în cursul studiilor de toxicitate cronică sau subcronică. De asemenea, ar trebui raportate concentrația reziduurilor (radioactive) și rapoartele țesut-plasmă (sangvină).

38. De asemenea, ar putea fi necesară sau solicitată de o autoritate competentă, evaluarea distribuției tisulare la momente precum cel al concentrației plasmatice/sangvine maxime (T_{max}) sau al ratei maxime de excreție urinară, obținute în urma studiilor de cinetică plasmatică/sangvină sau de excreție respective. Aceste informații pot fi utile pentru înțelegerea toxicității și a potențialului de acumulare și de persistență al substanței chimice testate și al metaboliților. Selecția probelor ar trebui justificată; în general, probele pentru analiză ar trebui să îndeplinească aceleași condiții ca mai sus (a se vedea punctul 37).

▼M4

39. Cuantificarea radioactivității pentru studiile privind distribuția tisulară poate fi efectuată prin disecarea, omogenizarea, combustia și/sau solubilizarea organelor, urmată de numărarea în scintilație lichidă (LSC) a reziduurilor capturate. Anumite tehnici, aflate în prezent în diferite stadii de evoluție, cum sunt autoradiografierea cantitativă a întregului organism și autoradiografierea microscopică a receptorilor, se pot dovedi utile pentru determinarea distribuției unei substanțe chimice testate în organe și/sau țesuturi (3) (4).

40. Pentru alte căi de expunere decât cea orală, ar trebui prelevate și analizate țesuturi specifice, precum cele pulmonare, în cazul studiilor de toxicitate prin inhalare, sau piele, în cazul studiilor de toxicitate cutanată. A se vedea punctele 74-78.

Metabolismul

41. Excrețiile (și, după caz, plasma) ar trebui să fie colectate pentru identificarea și cuantificarea substanței chimice testate și a metaboliților nemodificați, în conformitate cu descrierea de la punctele 44-49. Se acceptă gruparea excreției pentru a facilita identificarea metaboliților unui anumit grup tratat. Se recomandă stabilirea profilurilor metaboliților pentru fiecare perioadă. Totuși, dacă lipsa de probe și/sau marcare radioactivă împiedică aceasta, se acceptă gruparea urinei și fecalelor de la mai multe momente, dar nu se acceptă gruparea celor provenite de la sexe sau doze diferite. Urina, fecalele, radioactivitatea din expirația animalelor tratate și bila, după caz, ar trebui evaluate prin metode calitate și cantitative adecvate.

42. Ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru a se identifica toți metaboliții prezenți în procent de minimum 5 % din doza administrată și pentru a se alcătui o schemă metabolică pentru substanța chimică testată. Substanțele testate care au fost caracterizate în excreții ca reprezentând cel puțin 5 % din doza administrată ar trebui identificate. Această identificare constă în determinarea structurii exacte a componentelor. De obicei, identificarea este efectuată fie prin co-cromatografia metabolitului împreună cu etaloane cunoscute, folosind două sisteme diferite, sau prin tehnici de identificare structurală pozitivă, cum sunt spectrometria de masă, rezonanța magnetică nucleară (RMN) etc. În cazul co-cromatografiei, tehnicile cromatografice care utilizează aceeași fază staționară cu două sisteme de solvenți diferite nu sunt considerate ca fiind o metodă adecvată de dublă verificare a identității metabolitului, deoarece metodele nu sunt independente. Identificarea prin co-cromatografie ar trebui să fie obținută prin folosirea a două sisteme diferite și independente din punct de vedere analitic, precum cromatografia în strat subțire (CSS), cu fază inversă și cu fază normală, și cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). Dacă separarea cromatografică este de calitate adecvată, confirmarea suplimentară prin mijloace spectroscopice nu este necesară. Alternativ, identificarea clară mai poate fi obținută utilizând metode care furnizează informații structurale cum sunt: cromatografia de lichide/spectrometria de masă (LC-MS), cromatografia de lichide/spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS), cromatografia de gaze/spectrometria de masă (GC-MS) și spectrometria RMN.

43. Dacă identificarea metaboliților în procent de minimum 5 % din doza administrată nu este posibilă, această situație ar trebui justificată/explicată în raportul final. Identificarea metaboliților care reprezintă sub 5 % din doza administrată poate fi utilă pentru o mai bună înțelegere a căii metabolice, pentru evaluarea pericolelor și/sau a riscurilor asociate substanței chimice testate. Ar trebui să se furnizeze o confirmare structurală ori de câte ori acest lucru este posibil. Aceasta poate include stabilirea profilului în plasmă, sânge sau alte țesuturi.

▼M4

Excreția

44. Rata și gradul de excreție a dozei administrate ar trebui să fie determinate prin măsurarea procentului dozei (radioactive) recuperate din urină, fecale și aerul expirat. Aceste date vor ajuta și la calcularea bilanțului masic. Cantitățile de substanță chimică testată (radioactivitate) care au fost eliminate prin urină, fecale și aerul expirat ar trebui să fie determinate la intervale adecvate de timp (a se vedea punctele 47-49). Experimentele cu doză repetată ar trebui să fie proiectate în mod corespunzător, astfel încât să permită colectarea datelor de excreție pentru atingerea obiectivelor descrise la punctul 26. Aceasta va permite realizarea unei comparații cu studiile în care se administrează o doză unică.

45. Dacă un studiu pilot a demonstrat că în aerul expirat nu a fost excretată nicio cantitate semnificativă din substanța chimică testată (radioactivitate) (conform punctului 49), aerul expirat nu ar trebui să fie colectat în studiul definitiv.

46. Fiecare animal ar trebui să fie plasat într-o unitate metabolică separată pentru colectarea excrețiilor (urină, fecale și aer expirat). La sfârșitul fiecărei perioade de prelevare (a se vedea punctele 47-49), unitățile metabolice se curăță cu un solvent adecvat (procedură denumită „spălarea cuștii”), care permite recuperarea cu maximă eficiență a substanței chimice testate (radioactivitate). Prelevarea excrețiilor ar trebui să înceteze după 7 zile sau, în caz contrar, după recuperarea a cel puțin 90 % din doza administrată.

47. Cantitățile totale de substanță chimică testată (radioactivitate) din urină ar trebui să se determine de cel puțin două ori în prima zi de prelevare, una dintre acestea ar trebui să aibă loc la 24 de ore după administrarea dozei, iar apoi zilnic, până la încheierea studiului. Se recomandă prelevarea de probe la mai mult de două momente în prima zi (de exemplu, la 6, 12 și 24 de ore). Rezultatele studiilor pilot ar trebui analizate pentru obținerea de informații privind momente alternative sau suplimentare de prelevare. Graficele de prelevare utilizate ar trebui justificate.

48. Cantitățile totale de substanță chimică testată (radioactivitate) din fecale ar trebui să se determine zilnic, începând cu 24 de ore de la prima administrare a dozei și până la încheierea studiului, cu excepția cazului în care studiile pilot sugerează momente alternative sau suplimentare de prelevare. Graficele alternative de prelevare utilizate ar trebui justificate.

49. Prelevarea CO_2 expirat și a altor materiale volatile poate fi întreruptă în cursul unui studiu experimental în cazul în care în aerul expirat se determină mai puțin de 1 % din doza administrată într-un interval de prelevare de 24 de ore.

Studii privind evoluția în timp

Cinetica plasmatică/sangvină

50. Scopul acestor studii este de a obține estimări ale parametrilor toxicocinetici de bază [de exemplu, C_{max}, T_{max}, timp de înjumătățire ($t_{1/2}$), ASC] ai substanței chimice testate. Aceste studii pot fi efectuate la o doză unică sau, mai probabil, la cel puțin două doze. Nivelul dozei ar trebui să fie stabilit în funcție de natura experimentului și/sau problema studiată. Datele cinetice pot fi necesare pentru identificarea unor aspecte precum biodisponibilitatea substanței chimice testate și/sau pentru a clarifica efectul dozei asupra eliminării (de exemplu, pentru a clarifica dacă saturarea eliminării depinde de doză).

51. Pentru aceste studii ar trebui utilizate cel puțin patru animale de același sex în fiecare grup de doză. Ar trebui prezentată o justificare pentru sexul animalelor utilizate. Ar trebui avută în vedere utilizarea animalelor de ambele sexe (patru masculi și patru femele) atunci când există indicii privind diferențe semnificative de toxicitate în legătură cu sexul.

▼M4

52. După ce substanța chimică testată (marcată radioactiv) a fost administrată, ar trebui prelevate probe de sânge de la fiecare animal, la intervale adecvate, folosind metodologia corespunzătoare de prelevare. Volumul și numărul probelor de sânge care pot fi prelevate de la fiecare animal pot fi limitate de eventualele efecte ale prelevării repetate asupra sănătății/fiziologiei animalelor și/sau asupra sensibilității metodei analitice. Se analizează toate probele de la fiecare animal. În unele cazuri (de exemplu, caracterizarea metaboliților), poate fi necesară gruparea probelor de la mai multe animale. Probele grupate ar trebui să fie identificate în mod clar și să fie însoțite de o justificare a grupării. Dacă se utilizează o substanță marcată radioactiv, poate fi necesară analizarea radioactivității prezente totale. În acest caz, radioactivitatea totală ar trebui analizată fie în sângele integral și în plasmă, fie în plasmă și în globulele roșii pentru a permite calcularea raportului sânge/plasmă. În alte cazuri, pot fi necesare investigații mai specifice care necesită identificarea compusului de origine și/sau a metaboliților sau evaluarea legării de proteine.

Cinetica altor țesuturi

53. Scopul acestor studii este de a obține informații privind evoluția în timp, pentru analizarea unor aspecte precum modul de acțiune toxică, bioacumularea și biopersistența prin determinarea nivelurilor substanței chimice testate în diverse țesuturi. Selecția țesuturilor și a numărului de momente evaluate va depinde de aspectul vizat și de baza de date toxicologică referitoare la substanța chimică testată. Proiectarea acestor studii suplimentare de cinetică a țesuturilor ar trebui să țină seamă de informațiile obținute în conformitate descrierea de la punctele 37-40. Aceste studii pot implica administrarea unei doze unice sau a unor doze repetate. Fiecare abordare ar trebui justificată în detaliu.

54. Motivele pentru efectuarea unor studii privind cinetica altor țesuturi pot include:

— identificarea unui timp de înjumătățire în sânge extins, care sugerează o posibilă acumulare a substanței chimice în diferite țesuturi; sau

— interesul de a vedea dacă s-a atins o stare staționară în anumite țesuturi (de exemplu, în cadrul studiilor cu doză repetată, chiar dacă a fost obținut un nivel aparent staționar al substanței chimice testate în sânge, poate fi de interes să se stabilească dacă a fost obținut un nivel staționar și în țesuturile țintă).

55. Pentru aceste tipuri de studii privind evoluția în timp se administrează o doză orală corespunzătoare din substanța chimică testată la cel puțin patru animale, la fiecare interval de administrare, și se urmărește evoluția în timp a distribuției în țesuturile relevante. Pot fi utilizate numai animale de același sex, cu excepția cazurilor în care se observă o toxicitate specifică unui anumit sex. Analiza radioactivității totale sau a substanței chimice de origine și/sau a metaboliților va depinde, de asemenea, de problema studiată. Evaluarea distribuției tisulare ar trebui realizată folosind tehnici adecvate.

Inducția/inhibarea enzimatică

56. Studiile care abordează posibilele efecte ale inducției/inhibării enzimatice sau biotransformării substanței studiate pot fi necesare în unul sau mai multe din cazurile următoare:

1. dovezile disponibile indică o legătură între biotransformarea substanței chimice testate și creșterea toxicității;

2. datele de toxicitate disponibile indică o legătură neliniară între doză și metabolism;

▼M4

3. rezultatele studiilor de identificare a metaboliților demonstrează existența unui metabolit cu potențial toxic care ar fi putut să fie produs pe o cale enzimatică indusă de substanța chimică testată;

4. pentru explicarea efectelor posibil legate de fenomenele de inducție a enzimelor;

5. dacă în cursul experimentelor *in vitro* sau *in vivo* cu specii sau în condiții diferite se observă modificări toxicologice semnificative ale profilului metabolic al substanței chimice testate, poate fi necesară caracterizarea enzimei (enzimelor) implicate (de exemplu, enzimele de fază I, cum sunt izoenzimele sistemului mono-oxigenază dependent de citocromul P450, enzimele de fază II, cum sunt izoenzimele sulfotransferazei sau uridin-difosfat-glucuronil transferazei sau orice alte enzime relevante). Aceste informații pot fi utilizate pentru a evalua pertinența extrapolărilor interspecii.

57. Ar trebui utilizate protocoale de studiu adecvate pentru evaluarea modificărilor în toxicocinetica substanței chimice testate, validate și justificate corespunzător. Astfel de proiecte de studiu pot consta în administrarea de doze repetate cu substanță chimică testată nemarcată, urmate de administrarea unei doze unice marcate radioactiv în ziua a 14-a sau a unei doze repetate cu substanța chimică testată marcată radioactiv și de prelevarea de probe în zilele 1, 7 și 14, pentru determinarea profilurilor metaboliților. Administrarea de doze repetate cu substanța chimică testată marcată radioactiv poate oferi, de asemenea, informații privind bioacumularea (a se vedea punctul 26).

ALTE ABORDĂRI

58. Pe lângă experimentele *in vivo* descrise în această metodă de testare, alte abordări pot oferi informații utile privind absorbția, distribuția, metabolizarea sau eliminarea unei substanțe chimice testate la anumite specii.

Utilizarea informațiilor obținute din experimentele *in vitro*

59. Studiile *in vitro* care folosesc sisteme de testare adecvate pot răspunde la mai multe întrebări privind metabolizarea substanței chimice testate. Posibilii metaboliți pot fi studiați cu ajutorul hepatocitelor recent izolate sau cultivate și a fracțiilor subcelulare hepatice (de exemplu, microzomi și citozol sau fracția S9). Metabolizarea locală în organul țintă (de exemplu, plămân) poate prezenta interes pentru evaluarea riscurilor. În aceste scopuri pot fi utile fracțiile microzomiale ale organelor țintă. Studiile cu microzomi pot fi utile în abordarea posibilelor diferențe între sexe și stadii de viață și în caracterizarea parametrilor enzimatici (K_m și V_{max}), care pot ajuta la evaluarea dependenței de doză a metabolismului în raport cu nivelurile de expunere. În plus, microzomii pot fi utili pentru identificarea enzimelor microzomiale specifice implicate în metabolizarea substanței chimice testate, care se pot dovedi utile pentru extrapolarea între specii (a se vedea, de asemenea, punctul 56). Potențialul de inducție al biotransformării mai poate fi examinat folosind fracțiile subcelulare hepatice (de exemplu, microzomi și citozol) ale animalelor pretratate cu substanța chimică testată de interes, prin intermediul studiilor *in vitro* de inducție a hepatocitelor sau pe baza unor linii de celule specifice care produc enzimele relevante. În anumite circumstanțe și în condiții adecvate, poate fi avută în vedere utilizarea fracțiilor subcelulare provenite din țesuturi umane pentru determinarea posibilelor diferențe de biotransformare dintre specii. Rezultatele investigațiilor *in vitro* pot fi utilizate, de asemenea, în dezvoltarea modelelor PBTK (5).

▼M4

60. Studiile de absorbție cutanată *in vitro* pot oferi informații suplimentare pentru caracterizarea absorbției (6).

61. Culturile primare de celule pe bază de celule hepatice și secțiuni de țesuturi recente pot fi utilizate în abordarea unor probleme similare celor din cazul microzomilor hepatici. În anumite cazuri, este posibil să se răspundă la anumite întrebări prin utilizarea liniilor celulare care exprimă clar enzima relevantă sau a liniilor celulare modificate genetic. În anumite cazuri, se poate dovedi utilă studierea inhibării și a inducției izoenzimelor specifice citocromului P450 (de exemplu, CYP1A1, 2E1, 1A2 și altele) și/sau a enzimelor de fază II de către compusul de origine, folosind studii *in vitro*. Informațiile obținute pot fi relevante pentru compuși cu structuri similare.

Utilizarea datelor toxicocinetice din studiile de toxicitate ca informații complementare

62. Analiza probelor de sânge, țesuturi și/sau excreții obținute în cursul studiilor de toxicitate pot oferi date privind biodisponibilitatea, modificările concentrației plasmatice în timp (ASC, C_{max}), potențialul de bioacumulare, ratele de eliminare și modificările de metabolizare și cinetică în funcție de sex și vârstă.

63. Proiectul studiului poate fi utilizat pentru a răspunde la întrebări privind: saturația absorbției, căile de biotransformare sau de excreție la niveluri mai mari ale dozei; funcționarea noilor căi de metabolizare la doze mai mari și limitarea metaboliților toxici la doze mai mari.

64. Alte considerații privind evaluarea pericolelor ar putea include aspecte precum:

— sensibilitatea în funcție de vârstă datorită diferențelor privind starea barierei hematoencefalice, a rinichilor și/sau a capacităților de detoxifiere;

— sensibilitatea sub-populației ca urmare a diferențelor între capacitățile de biotransformare sau a altor diferențe toxicocinetice;

— gradul de expunere al fetusului prin transferul transplacental al substanțelor chimice sau al puilor nou-născuți prin alăptare.

Utilizarea modelării toxicocinetice

65. Modelele toxicocinetice se pot dovedi utile în diferite aspecte ale evaluării pericolelor și riscurilor, cum ar fi, de exemplu, predicția expunerii sistemice și a dozei transferate țesuturilor interne. În plus, pot fi elucidate probleme specifice privind modul de acțiune, iar modelele pot oferi o bază de extrapolare între specii, căi de expunere, modele de dozare și pentru evaluarea riscurilor la om. Indiferent de specie, datele utile pentru dezvoltarea modelelor PBTK ale unei substanțe chimice testate includ: 1. coeficienți de partiție; 2. constante biochimice și parametri fiziologici; 3. parametri de absorbție specifici căilor; și 4. date cinetice *in vivo* pentru evaluarea modelelor [de exemplu, parametrii de eliminare pentru căile de excreție relevante (> 10 %), K_m și V_{max} pentru metabolism]. Datele experimentale utilizate pentru dezvoltarea modelelor ar trebui să fie generate prin metode științifice valabile, iar rezultatele modelului ar trebui să fie validate. Parametrii specifici substanței chimice testate și speciilor, precum ratele de absorbție, coeficientul de partiție sânge-țesut și constantele ratei de metabolizare sunt adeseori determinate pentru a facilita dezvoltarea de modele necompartimentate sau fiziologice (7).

▼M4

DATE ŞI RAPORT

66. Se recomandă ca raportul studiului să conțină un cuprins.

Conținutul raportului

67. Conținutul raportului ar trebui să includă informații tratate de această metodă de testare, organizate în secțiuni și puncte, după cum urmează:

Rezumat

68. Această secțiune a raportului studiului ar trebui să conțină un rezumat al proiectului studiului și o descriere a metodelor utilizate. De asemenea, acesta ar trebui să evidențieze rezultatele cheie privind bilanțul masic, natura și magnitudinea metaboliților, reziduurile din țesuturi, rata de eliminare, potențialul de bioacumulare, diferențele între sexe etc. Rezumatul ar trebui să fie suficient de detaliat pentru a permite evaluarea rezultatelor.

Introducere

69. Această secțiune a raportului ar trebui să includă obiectivele, justificarea și proiectul studiului, precum și referințele bibliografice corespunzătoare și eventualul context al acestuia.

Materiale și metode

70. Această secțiune a raportului ar trebui să includă o descriere detaliată a tuturor informațiilor pertinente, inclusiv:

(a) substanța chimică testată

Această subsecțiune ar trebui să includă identificarea substanței chimice testate: denumirea chimică, structura moleculară, determinarea calitativă și cantitativă a compoziției chimice, puritatea chimică și, atunci când este posibil, tipul și cantitățile impurităților. De asemenea, aceasta ar trebui să includă informații referitoare la proprietățile fizico-chimice, inclusiv starea fizică, culoarea, solubilitatea brută și/sau coeficientul de partiție, stabilitatea și, după caz, corozivitatea. Dacă este necesar, ar trebui furnizate informații privind izomerii. În cazul în care substanța chimică testată este marcată radioactiv, în această subsecțiune ar trebui introduse informații referitoare la: tipul de radionuclid, poziția marcajului, activitatea specifică și puritatea radiochimică.

Ar trebui indicate tipul sau descrierea oricăror vehicule, diluanți, agenți de suspensie și emulgatori, precum și orice alte materiale utilizate pentru administrarea substanței chimice testate;

(b) animalele utilizate în scopuri experimentale

Această subsecțiune ar trebui să conțină informații privind animalele utilizate în scopuri experimentale, inclusiv selectarea și justificarea speciei, suşei și a vârstei la începerea studiului, sexul, greutatea corporală, starea de sănătate și condițiile de creștere a animalului;

(c) metodele

Această subsecțiune ar trebui să includă detalii privind proiectul studiului și metodologia utilizată. Aceasta ar trebui să conțină o descriere referitoare la:

1. justificarea oricărei modificări a căii și a condițiilor de expunere, după caz;

▼M4

2. justificarea selectării nivelurilor dozei;

3. descrierea studiilor pilot utilizate în proiectarea experimentală a studiilor de urmărire, după caz. Ar trebui prezentate datele de susținere din studiul pilot;

4. modul de preparare a soluției de dozare și tipul eventualului solvent sau vehicul utilizat;

5. numărul grupurilor de tratament și numărul animalelor din fiecare grup;

6. nivelul și volumul dozelor (și, în cazul utilizării radioactivității, activitatea specifică a dozei);

7. calea (căile) și metodele de administrare;

8. frecvența de administrare a dozelor;

9. perioadele de privare de hrană (dacă se utilizează);

10. radioactivitatea totală a fiecărui animal;

11. manipularea animalelor;

12. prelevarea și manipularea probelor;

13. metodele analitice utilizate pentru separarea, cuantificarea și identificarea metaboliților;

14. limita de detecție pentru metodele utilizate;

15. alte măsurători și proceduri experimentale utilizate (inclusiv validarea metodelor de analiză a metaboliților);

(d) analiza statistică

Dacă rezultatele studiului sunt examinate folosind analiza statistică, ar trebui să fie incluse informații suficiente privind metoda de analiză și programul informatic utilizate, astfel încât un auditor/statistician independent să poată reevalua și reface analiza.

În cazul studiilor de modelare a sistemelor, precum PBTK, modelul ar trebui să fie prezentat suficient de detaliat pentru a permite reconstrucția și validarea independentă a modelului (a se vedea punctul 65 și apendicele „Definiții”).

Rezultate

71. Toate datele ar trebui să fie prezentate sub formă de rezumat și tabelar, însoțite de evaluarea statistică adecvată și descrise în textul acestei secțiuni. Datele de contorizare a radioactivității ar trebui să fie rezumate și prezentate în forma corespunzătoare pentru studiu, de obicei în echivalenți microgram sau miligram pe masa de probă, dar pot fi utilizate și alte unități. Această secțiune ar trebui să includă ilustrări grafice ale rezultatelor, reproducerea datelor cromatografice și spectrometrice reprezentative, identificarea/cuantificarea metaboliților și căile metabolice propuse, inclusiv structura moleculară a metaboliților. În plus, în această secțiune vor fi introduse, după caz, următoarele informații:

1. cantitatea și procentul recuperare a radioactivității din urină, fecale, aerul expirat și din reziduurile de urină și fecale colectate la spălarea cuștii:

— pentru studiile cutanate vor mai fi incluse, de asemenea, date privind substanța chimică testată recuperată din pielea tratată, spălările pielii, radioactivitatea reziduală din dispozitivul care acoperiră pielea și din unitatea metabolică, precum și rezultatele studiului de spălare a substanței de pe piele. Pentru discuții suplimentare, a se vedea punctele 74-77;

▼M4

— pentru studiile prin inhalare vor mai fi incluse, de asemenea, date privind recuperarea substanței chimice testate din plămâni și țesuturile nazale (8). Pentru discuții suplimentare, a se vedea punctul 78;

2. distribuția tisulară, raportată ca procent din doza și din concentrația administrată (echivalent micrograme pe gram de țesut) și rapoartele țesut-sânge sau țesut-plasmă;

3. bilanțul de materiale rezultat din fiecare studiu presupunând analizarea țesuturilor corporale și a excreției;

4. concentrațiile plasmatice și parametrii toxicocinetici (biodisponibilitate, ASC, Cmax, Tmax, eliminare, timp de înjumătățire) după administrarea pe calea (căile) relevantă (relevante) de expunere;

5. rata și nivelul de absorbție a substanței chimice testate după administrarea pe calea (căile) relevantă (relevante) de expunere;

6. cantitățile de substanță chimică testată și de metaboliți (raportate ca procent din doza administrată) prelevate din excreții;

7. o trimitere la datele anexate care conțin date pentru fiecare animal pentru toate efectele măsurate (de exemplu, administrarea dozei, procentul de substanță recuperată, concentrațiile, parametrii toxicocinetici etc.);

8. o figură conținând căile metabolice propuse și structurile moleculare ale metaboliților.

Discuție și concluzii

72. În această secțiune, autorul (autorii) ar trebui:

1. să propună o cale metabolică pe baza rezultatelor metabolizării și a eliminării substanței chimice testate;

2. să discute orice posibilă diferență între specii și sexe privind eliminarea și/sau biotransformarea substanței chimice testate;

3. să prezinte în formă tabelară și să discute identificarea și amploarea metaboliților, ratele de eliminare, potențialul de bioacumulare și nivelul reziduurilor în țesuturi al substanței de origine și/sau a metaboliților, precum și posibilele modificări ale parametrilor toxicocinetici în funcție de variația dozei, după caz;

4. să introducă în această secțiune orice date toxicocinetice relevante obținute în cursul studiilor de toxicitate;

5. să prezinte o concluzie concisă care poate fi susținută de rezultatele studiului;

6. să adauge secțiuni (după caz sau dacă este necesar).

73. Ar trebui utilizate secțiuni suplimentare care să conțină informații bibliografice, tabele, figuri, apendice etc.

▼M4

CĂI ALTERNATIVE DE EXPUNERE

Calea cutanată

Tratament cutanat

74. Această secțiune oferă informații specifice privind investigarea toxicocineticii substanței chimice testate administrate pe cale cutanată. Pentru absorbția cutanată, ar trebui consultat capitolul B.44 din prezenta anexă [Absorbția cutanată: metoda de testare *in vivo* (9)]. Prezenta metodă de testare B.36 poate fi utilizată și pentru alte puncte finale, cum sunt distribuția și metabolismul. În tratamentul cutanat ar trebui folosite unul sau mai multe niveluri ale dozei de substanță chimică testată. Substanța chimică testată (de exemplu materialul pur, diluat sau amestec care conține substanța chimică testată aplicată pe piele) ar trebui să fie același (sau un înlocuitor adecvat) cu preparatul la care pot fi expuși omul sau alte specii țintă posibile. Nivelul (nivelurile) dozei ar trebui selectate în conformitate cu punctele 20-26 din această metodă de testare. Factorii care pot fi luați în considerare în stabilirea dozei cutanate sunt expunerea preconizată la om și/sau dozele la care au fost observate efecte toxice în alte studii de toxicitate cutanată. Dacă este necesar, doza (dozele) cutanată (cutanate) ar trebui să fie dizolvate într-un vehicul adecvat și aplicate într-un volum suficient pentru administrare. Cu puțin timp înainte de testare, blana din regiunea dorsală a animalelor ar trebui tunsă. Blana poate fi și rasă, dar o astfel de operațiune ar trebui efectuată cu aproximativ 24 de ore înainte de test. Când se tunde sau se rade blana ar trebui acordată atenție pentru a nu se leza pielea, acest lucru putându-i afecta permeabilitatea. Zona care se degajează în vederea aplicării substanței chimice testate ar trebui să fie de aproximativ 10 % din suprafața corporală. În cazul substanțelor foarte toxice, suprafața tratată poate fi mai mică de 10 %, însă substanța ar trebui să fie aplicată într-un strat cât mai subțire și mai uniform posibil pe o parte cât mai mare posibil din această suprafață. Aceeași suprafață de tratare ar trebui să fie utilizată la toate grupurile de testare cutanată. Zonele tratate ar trebui să fie protejate prin acoperire permanentă cu un material adecvat, fixat pe suprafață. Animalele ar trebui să fie adăpostite în incinte individuale.

75. Ar trebui efectuat un studiu de spălare cutanată, pentru a evalua cantitatea de doză de substanță chimică testată aplicată care poate fi îndepărtată prin spălare cu un săpun neutru și apă a zonei de piele tratate. Acest studiu poate, de asemenea, să ajute la stabilirea bilanțului masic atunci când substanța chimică testată se administrează pe cale cutanată. Pentru acest studiu de spălare cutanată ar trebui aplicată o doză unică de substanță chimică testată pe două animale. Nivelul dozei este stabilit în conformitate cu punctul 23 al acestei metode de testare (a se vedea, de asemenea, discuția privind perioada de contact cu pielea de la punctul 76). Pentru a evalua eficiența îndepărtării substanței chimice testate prin procedura de spălare ar trebui să se determine cantitatea de substanță chimică testată care a fost recuperată din reziduurile de spălare.

76. Cu excepția cazurilor în care apare corozivitate, substanța chimică testată ar trebui aplicată și păstrată pe piele timp de cel puțin 6 ore. După înlăturarea materialului protector, zona tratată ar trebui spălată conform procedurii prevăzute de studiul de spălare cutanată (a se vedea punctul 75). Atât materialul protector cât și reziduurile de spălare ar trebui analizate pentru identificarea reziduurilor substanței chimice testate. La încheierea studiilor, fiecare animal ar trebui eutanasiat în conformitate cu punctul 2, iar pielea tratată ar trebui eliminată. O porțiune adecvată din pielea tratată ar trebui analizată pentru identificarea reziduurilor de substanță chimică testată (radioactivitate).

77. Pentru evaluarea toxicocinetică a produselor farmaceutice pot fi necesare proceduri diferite, în conformitate cu prevederile sistemului de reglementare relevant.

▼M4

Inhalare

78. Ar trebui utilizată o singură concentrație (sau mai multe, dacă este necesar) a substanței chimice testate. Concentrația (concentrațiile) ar trebui selectate în conformitate cu punctele 20-26 din această metodă de testare. Tratamentele prin inhalare urmează a se efectua cu ajutorul dispozitivelor de inhalare nazală sau care se fixează pe cap, pentru a preveni absorbția prin alte căi de expunere (8). Dacă se utilizează alte condiții de expunere, justificarea pentru modificarea acestora ar trebui documentată. Durata de expunere prin inhalare ar trebui să fie stabilită anterior; de obicei, aceasta durează 4-6 ore.

BIBLIOGRAFIE:

(1) OECD (2009), Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J. Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography, J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400-411.

(6) Capitolul B.45 din prezenta anexă, „Absorbția cutanată: Metoda de testare *in vitro*".

(7) IPCS (2010), Characterization and application of Physiologically-Based-Pharmacokinetic Models in Risk Assessment, IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolul B.44 din prezenta anexă, „Absorbția cutanată: Metoda de testare *in vivo*".

(10) Barton H.A. *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M. and Perrier D. (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼**M4**

Apendice

DEFINIȚII

Absorbție*:* Procesul (procesele) de asimilare a substanțelor chimice în interiorul țesuturilor sau între acestea. Absorbția se referă la compusul de origine și la toți metaboliții săi. A nu se confunda cu „biodisponibilitatea”.

Acumulare *(Bioacumulare):* Creșterea în timp a cantității unei substanțe chimice testate în țesuturi (de obicei, în țesuturile adipoase, după expunere repetată); dacă substanța chimică testată intră în corp mai repede decât este eliminată, organismul o acumulează, ceea ce poate conduce la creșterea concentrațiilor toxice.

ADME*:* Acronim pentru „Absorbție, distribuție, metabolism și excreție”.

ASC*:* Zona de sub curba concentrație plasmatică în funcție de timp (*Area under the plasma concentration-time curve*): zona aflată sub curba unui grafic care reprezintă concentrația substanței chimice testate în plasmă în funcție de timp. Aceasta reprezintă cantitatea totală de substanță chimică testată absorbită de organism într-o anumită perioadă de timp. În condiții liniare, ASC (de la momentul zero la infinit) este proporțională cu cantitatea totală a substanței chimice testate care a fost absorbită de către organism, indiferent de rata de absorbție.

Autoradiografie*:* (autoradiografia întregului corp): Utilizată pentru determinarea, din punct de vedere cantitativ și/sau calitativ, a localizării unei substanțe chimice testate radioactive în țesuturi, această tehnică utilizează razele X sau, mai recent, fosforimagistica digitală pentru a vizualiza moleculele sau fragmentele de molecule marcate radioactiv prin înregistrarea radiațiilor emise în interiorul obiectului studiat. Comparativ cu disecția organelor, autoradiografia cantitativă a întregului corp poate prezenta anumite avantaje în evaluarea distribuției substanței chimice testate și în aprecierea recuperării și resorbției generale a materialului radioactiv în țesuturi. De exemplu, unul din cele mai importante avantaje constă în faptul că poate fi utilizată într-un model pentru animale pigmentate pentru a evalua posibila asociere a substanței chimice testate cu melanina, aceasta din urmă având capacitatea de a se lega de anumite molecule. Totuși, deși poate oferi imagini de ansamblu ale locurilor cu capacitate ridicată/afinitate redusă de legare din întregul corp, această tehnică poate fi limitată în recunoașterea locurilor țintă specifice, cum sunt locurile de legare la receptori, care necesită o rezoluție și o sensibilitate înalte pentru a fi detectate. Atunci când se utilizează tehnica autoradiografierii, experimentele care au ca scop determinarea bilanțului masic al compusului administrat ar trebui efectuate pe un grup separat sau în cadrul unui studiu separat de experimentul de distribuție tisulară, prin care toate excrețiile (care pot include și aerul expirat) și carcasele integrale sunt omogenizate și analizate prin numărare în scintilație lichidă.

Excreție biliară*:* Excreție prin căile biliare.

Bioacumulare*:* A se vedea „acumulare”.

Biodisponibilitate*:* Fracție a unei doze administrate care intră în circulația sistemică sau care devine disponibilă la locul activității fiziologice. De obicei, biodisponibilitatea unei substanțe chimice testate se referă la compusul de origine, dar ar putea să se refere și la metabolitul acestuia. Biodisponibilitatea ia în considerare o singură formă chimică. *Nota bene*: biodisponibilitatea și absorbția sunt noțiuni diferite. Diferența între, de exemplu, absorbția orală (prezența în peretele intestinal și în circulația portală) și biodisponibilitate (prezența în sângele sistemic și în țesuturi) poate apare ca urmare a degradării

▼M4

chimice provocate de factori precum metabolizarea în peretele intestinal, transportul efluxului înapoi în lumenul intestinal sau metabolizarea presistemică hepatică (10). Biodisponibilitatea componentei toxice (compus de origine sau un metabolit) reprezintă un parametru critic al evaluării riscului la om (extrapolarea dozei în sens descendent, extrapolarea de la o cale la alta), utilizat pentru derivarea unei valori interne pe baza NOAEL sau BMD externe (doza aplicată). Absorbția orală este un parametru suficient de evaluare a efectelor hepatice la administrare orală. Totuși, pentru evaluarea oricărui alt efect în afara locului de intrare, biodisponibilitatea este, în general, un parametru mai fiabil decât absorbția pentru evaluarea riscurilor.

Biopersistență*:* A se vedea „persistență”.

Biotransformare*:* Conversia chimică (de obicei enzimatică) a unei substanțe chimice testate de interes într-o substanță chimică diferită în interiorul corpului. Sinonim cu „metabolism”.

C_{max}*:* Concentrația maximă (de vârf) în sânge (plasmă/ser) după administrare sau excreția maximă (de vârf) (în urină sau fecale) după administrare.

Rată de eliminare*:* Măsura cantitativă a ratei cu care substanța chimică testată este îndepărtată din sânge, plasmă sau anumite țesuturi în unitatea de timp.

Compartiment*:* Porțiune (sau unitate) structurală sau biochimică individuală a unui corp, țesut sau celulă, separată de rest.

Căi de detoxifiere*:* Serie de etape de eliminare a substanțelor chimice toxice din organism, prin modificare metabolică sau prin excreție.

Distribuție*:* Dispersia unei substanțe chimice testate și a derivaților săi în tot organismul.

Enzime/Izoenzime*:* Proteine care catalizează reacții chimice. Izoenzimele sunt enzime care catalizează reacții chimice similare, dar care prezintă secvențe diferite ale aminoacizilor.

Parametri enzimatici*:* K_m: constanta Michaelis și V_{max}: viteza maximă.

Excreție*:* Proces(e) prin care substanța chimică testată administrată și/sau metaboliții săi sunt îndepărtați din organism.

Exogen*:* Introdus din sau produs în afara organismului sau sistemului.

Extrapolare*:* Deducerea (derivarea) uneia sau mai multor valori necunoscute pe baza informațiilor deja cunoscute sau observate.

Timp de înjumătățire ($t_{1/2}$)*:* Perioada necesară pentru scăderea cu 50 % a concentrației substanței chimice testate dintr-un compartiment. De obicei, se referă la concentrația plasmatică sau la cantitatea substanței chimice testate din întregul corp.

Inducție/Inducție enzimatică*:* Sinteza enzimatică declanșată de un stimul de mediu sau de o moleculă inductoare.

Liniaritate/cinetică liniară*:* Un proces este liniar din punct de vedere cinetic atunci când toate vitezele de transfer între compartimente sunt proporționale cu cantitățile sau concentrațiile prezente, adică de ordinul întâi. Prin urmare, volumele de eliminare și de distribuție și timpii de înjumătățire sunt constanți. Concentrațiile obținute sunt proporționale cu rata dozării (expunerea), iar acumularea poate fi mai ușor de anticipat. Liniaritatea/neliniaritatea poate fi evaluată prin compararea parametrilor relevanți, de exemplu ASC, după administrarea de doze diferite sau după expuneri unice și repetate. Lipsa dependenței de doză poate indica saturația enzimelor implicate în metabolizarea compusului, creșterea ASC după expunere repetată în raport cu expunerea unică poate fi un simptom de inhibare a metabolismului, în timp ce o scădere a ASC poate indica inducerea metabolismului (a se vedea, de asemenea, punctul 11).

▼M4

Bilanț masic*:* Cuantificarea cantităților de substanță chimică testată care intră și ies din organism.

Bilanț de materiale*:* A se vedea „bilanț masic”.

Mecanism (mod) de toxicitate/Mecanism (mod) de acțiune*:* Mecanismul de acțiune se referă la interacțiuni biochimice specifice prin care o substanță chimică testată își produce efectul. Modul de acțiune se referă la căile generale care conduc la toxicitatea unei substanțe chimice testate.

Metabolism*:* Sinonim cu „biotransformare”.

Metaboliți*:* Produși ai metabolismului sau ai proceselor metabolice.

Absorbție orală*:* Procentul dozei de substanță chimică testată absorbită de la locul de administrare (de exemplu, tractul GI). Acest parametru critic poate fi utilizat pentru identificarea fracției din substanța chimică testată administrată care intră în vena portă, apoi în ficat.

Coeficient de partiție*:* Cunoscut și sub denumirea de coeficient de distribuție, acesta reprezintă o măsură a diferențelor de solubilitate ale unei substanțe chimice în doi solvenți.

Niveluri maxime în sânge (ser/plasmă)*:* Concentrația maximă (de vârf) în sânge (plasmă/ser) după administrare (a se vedea, de asemenea, „C_{max}”).

Persistență (biopersistență)*:* Prezența pe termen lung a unei substanțe chimice (într-un sistem biologic) ca urmare a rezistenței la degradare/eliminare.

Extrapolare*:* Informațiile privind efectul produs de una sau mai multe substanțe chimice sunt utilizate pentru a anticipa efectul produs de substanța chimică țintă.

Autoradiografie microscopică a receptorilor *(sau microautoradiografia receptorilor):* Această tehnică poate fi utilizată pentru identificarea interacțiunii xenobiotice cu siturile tisulare sau cu populații celulare specifice, de exemplu în cadrul studiilor privind legarea la receptori sau a celor privind modul specific de acțiune, care pot necesita o rezoluție și o sensibilitate înaltă ce nu sunt disponibile prin alte tehnici, cum este autoradiografierea întregului corp.

Cale de administrare *(orală, intravenoasă, cutanată, inhalare etc.):* Se referă la mijloacele de introducere a substanțelor chimice în corp (de exemplu, prin gavaj oral sau prin alimentație, pe cale cutanată, prin inhalare, intravenos etc.).

Saturație*:* Stare în care unul sau mai multe din procesele cinetice (de exemplu, absorbție, metabolism sau eliminare) se află la valori maxime (sunt „saturate”).

Sensibilitate*:* Capacitatea unei metode sau a unui instrument de a face diferența între rezultate măsurătorilor reprezentând niveluri diferite ale unei variabile de interes.

Stare staționară a concentrației sangvine (plasmatice)*:* Stare care nu a atins echilibrul unui sistem deschis, prin care toate forțele care acționează asupra sistemului sunt contrabalansate de forțe opuse similare, astfel încât toate componentele sistemului au o concentrație staționară în ciuda faptului că prin acesta continuă să circule materie.

Modelarea sistemelor *(toxicocinetică pe bază fiziologică, pe bază farmacocinetică, farmacocinetică pe bază fiziologică, pe bază biologică etc.):* Model abstract care utilizează limbajul matematic pentru a descrie comportamentul unui sistem.

Țesut-țintă*:* țesut în care se manifestă unul din principalele efecte adverse al unei substanțe toxice.

▼M4

Substanță chimică testată: Orice substanță sau amestec chimic care se testează utilizându-se această metodă de testare.

Distribuție tisulară: Deplasare reversibilă a unei substanțe chimice testate în diferite locuri din corp. Distribuția tisulară poate fi studiată prin disecția, omogenizarea sau combustia organelor, numărare în scintilație lichidă sau prin autoradiografiere calitativă și/sau cantitativă a întregului corp. Prima metodă este utilă pentru calcularea concentrației și a procentului de recuperare din țesuturile și carcasele reziduale ale acelorași animale, dar rezoluția sa poate să nu fie suficientă pentru toate țesuturile și poate să prezinte o capacitate de recuperare generală inferioară celei optime (< 90 %). Definiția ultimei metode este disponibilă mai sus.

$\mathbf{T_{max}}$: Perioada necesară pentru atingerea C_{max}.

Toxicocinetică (farmacocinetică): Studiul absorbției, distribuției, metabolismului și excreției substanțelor chimice în timp.

Validarea modelelor: Procesul de evaluare a capacității unui model de a descrie datele toxicocinetice disponibile într-o manieră consecventă. Modelele pot fi evaluate prin comparare statistică și vizuală a valorilor anticipate de acestea cu valorile experimentale, în funcție de o variabilă independentă comună (de exemplu, perioada). Sfera evaluării ar trebui justificată în funcție de utilizarea preconizată pentru model.

▼B

B.37. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE DUPĂ EXPUNERE ACUTĂ

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Atunci când se face evaluarea efectelor toxice ale unor substanțe, este important să se studieze capacitatea pe care o prezintă unele substanțe de a provoca anumite tipuri de neurotoxicitate pe care alte tipuri de studii nu ar putea să le evidențieze. Unii compuși organofosforici prezintă o neurotoxicitate întârziată și trebuie să fie analizate în cadrul unor asemenea studii.

Teste de depistare *in vitro* pot fi utilizate în vederea identificării substanțelor care pot provoca o polineuropatie întârziată; cu toate acestea, rezultatele negative în urma unor teste *in vitro* nu sunt suficiente pentru a demonstra că substanța testată nu este neurotoxică.

A se vedea și introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

Substanțele organofosforice includ esteri, tioesteri organofosforici neîncărcați sau anhidride ale acizilor organofosforici, organofosfonici sau organofosforamidici sau ale acizilor fosforotioci, fosfonotioci sau fosforotioamidici din aceeași clasă sau ale unor substanțe care pot provoca neurotoxicitatea întârziată detectabilă câteodată la substanțele din această clasă.

Neurotoxicitatea întârziată este un sindrom asociat cu instalarea prelungită a unei ataxii întârziate, asociate cu axonopatii distale la nivelul măduvei spinării și a nervilor periferici și cu o inhibare și o îmbătrânire a esterazei caracteristică neuropatiilor (neuropathy target esterase – NTE) în țesuturile nervoase.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

O substanță de referință poate fi testată pe un lot martor pozitiv, astfel încât să se demonstreze că, în condițiile de testare, reacția preconizată a speciei nu s-a schimbat în mod semnificativ.

Un exemplu de substanță neurotoxică cu spectru larg de utilizare este fosfat tri-o-tolil-ul (nr. CAS 78-30-8, nr. EINECS 201-103-5, nomenclatura CAS: acid fosforic, tris(2-metilfenil)ester, cunoscut și sub numele de tris-o-cresilfosfat).

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța testată va fi administrată pe cale orală, într-o singură doză, unor găini de casă protejate, după caz, contra efectelor colinergice acute. Animalele sunt ținute sub observație timp de 21 de zile în vederea detectării anomaliilor de comportament, unei ataxii sau a unei paralizii. Sunt efectuate măsurători biochimice, în special pentru evidențierea inhibării esterazei NTE, pe găinile selecționate aleator din fiecare grup, în general la 24 și la 48 de ore după administrare. La 21 de zile după expunere, găinile care au mai rămas sunt sacrificate și se va efectua o examinare histopatologică a țesuturilor nervoase selecționate.

▼B

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Pregătirea testului**

Găini adulte tinere, fără afecțiuni virale sub tratamente care pot intra în interferență cu substanța testată și care nu prezintă tulburări ale aparatului locomotor, sunt distribuite aleator în grupuri experimentale și în loturi martor și lăsate să se aclimatizeze la condițiile de laborator cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului.

Cuștile sau incintele sunt destul de voluminoase pentru a permite o mișcare liberă găinilor, astfel încât mersul lor să poată fi observat ușor.

Substanța testată va fi administrată în general pe cale orală, prin gavaj sau în capsule de gelatină sau printr-o metodă asemănătoare. Substanțele lichide pot fi administrate în mod direct sau dizolvate într-un vehicul adecvat, cum ar fi uleiul de porumb; substanțele solide trebuie dizolvate, dacă este posibil, altfel se poate întâmpla ca importante cantități de substanțe solide administrate în capsule de gelatină să nu fie absorbite în mod corespunzător. Dacă vehiculul este altul decât apa, caracteristicile sale toxice trebuie să fie cunoscute sau, în caz contrar, determinate înaintea începerii testului.

1.5.2. **Condiții de testare**

1.5.2.1. *Animalele de experiență*

Specia recomandată este găina domestică ouătoare adultă și tânără, de o vârstă cuprinsă între 8-12 luni (*Gallus gallus domesticus*). Se vor folosi rase și linii pure de mărime standard; în mod normal, găinile folosite au fost crescute în condiții care le-au permis mișcarea liberă.

1.5.2.2. *Număr și sex*

În afară de grupul experimental, va fi selecționat și un lot martor căruia i se administrează doar vectorul, precum și un lot martor pozitiv. Grupul căreia i se administrează doar vectorul va fi tratat la fel ca și grupul experimental, singura excepție constând în administrarea substanței testate.

Trebuie selecționat un număr suficient de ridicat de animale în fiecare grup, astfel încât să se poată sacrifica cel puțin șase în vederea efectuării măsurărilor biochimice (trei la ambele prelevări) și astfel încât să supraviețuiască cel puțin șase după perioada de observație de 21 de zile.

Lotul martor pozitiv poate fi studiat în paralel sau se pot folosi datele unui studiu realizat recent. Trebuie să fie constituit din cel puțin șase găini adulte tratate cu un produs neurotoxic cunoscut, cu efect întârziat; trei găini sunt rezervate măsurărilor biochimice și trei evidențierii semnelor patologice. Se recomandă actualizarea periodică a datelor istorice colectate anterior. Sunt selecționate alte grupuri martor pozitiv, în cazul în care una dintre condițiile esențiale ale testului (cum ar fi linia pură, alimentația, adăpostirea) va fi modificată de către laboratorul care efectuează testul.

▼B

1.5.2.3. *Doze*

Se recomandă efectuarea unui studiu preliminar pe un număr adecvat de găini, distribuite aleator în grupuri experimentale tratate cu doze diferite, în vederea determinării dozei care va fi utilizată în cadrul studiului principal. O anumită rată a mortalității este inevitabilă în acest studiu preliminar. Cu toate acestea, pentru a se evita moartea din cauza efectelor colinergice acute, se poate folosi atropina sau un alt agent protector care să nu perturbe reacția neurologică întârziată. Se pot folosi metode de testare diverse pentru a se evalua doza maximă care nu este letală la o substanță dată (a se vedea metoda B.1 *bis*). Datele colectate anterior pe găini sau alte informații de ordin toxicologic sunt luate, de asemenea, în considerare la determinarea dozei.

Doza utilizată în studiul principal trebuie să fie cât se poate de ridicată, avându-se în vedere rezultatele studiului anterior și limita superioară de 2 000 mg/kg greutate corporală. Oricare ar fi rata mortalității, trebuie să supraviețuiască un număr suficient de animale pentru a se putea efectua măsurările biochimice (șase) și examenele histologice (șase), în cea de-a 21-a zi. Se va utiliza atropina sau un alt agent care nu perturbă reacțiile neurotoxice întârziate, astfel încât să se evite mortalitatea datorită efectelor colinergice acute.

1.5.2.4. *Testul-limită*

Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 2 000 mg/kg greutate corporală/zi nu produce efecte toxice detectabile și dacă informațiile cu privire la substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea acestora, nu este necesar să se efectueze un studiu cu o doză mai ridicată. Testul-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

1.5.3. *Perioada de observație*

Perioada de observație este de 21 de zile.

1.5.4. **Procedură**

După administrarea unui agent protector în vederea evitării provocării morții din cauza efectelor colinergice acute, se administrează substanța testată într-o singură doză.

Observații generale

Observațiile încep imediat după expunere. Toate găinile sunt observate cu grijă de mai multe ori în cursul primelor două zile, după care cel puțin o dată pe zi, timp de 21 de zile sau până în data sacrificării. Se înregistrează toate manifestările de toxicitate, data apariției anomaliilor de comportament, tipul, gravitatea și durata lor. Ataxia se măsoară cu ajutorul unei scale de evaluare obișnuite cu cel puțin patru niveluri; paralizia trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe săptămână găinile destinate evidențierii semnelor patologice, sunt scoase din cuști și supuse unei activități locomotorii forțate, cum ar fi de exemplu urcarea pe scară, astfel încât să se faciliteze examinarea manifestării efectelor toxice ușoare. Animalele muribunde sau cele care prezintă semne de suferință sau dureri intense trebuie excluse imediat din studiu, eutanasiate și autopsiate.

▼B

Greutate corporală

Toate găinile sunt cântărite cu puțin înaintea administrării substanței, după care cel puțin o dată pe săptămână.

Biochimie

Șase găini selecționate aleator din fiecare grup experimental și din grupurile martor negative, precum și trei găini din lotul martor pozitiv (dacă testul este realizat în paralel și pe acesta) sunt sacrificate câteva zile după administrare, creierul și măduva spinării din zona lombară sunt preparate și analizate în vederea detectării inhibării esterazei caracteristică neuropatiilor. Pe lângă aceasta, poate să fie necesară și analiza inhibării acestei esteraze pe nervul sciatic. În general, sunt sacrificate trei găini din lotul martor și din fiecare grup experimental, după 24 de ore și alte trei, după 48 de ore, iar cele trei găini din lotul martor pozitiv sunt sacrificate după 24 de ore. Dacă observarea semnelor clinice de intoxicare (estimate deseori pe baza momentului apariției efectelor colinergice) indică faptul că substanța toxică se elimină în mod foarte lent, se poate să fie preferabilă prelevarea țesuturilor de la trei găini la alte intervale de timp, între 24 sau cel mult 72 de ore după administrare.

Dacă este necesar, se pot efectua, de asemenea, determinări de acetilcolinesterază (AChE) pe eșantioane. Cu toate acestea, poate avea loc *in vivo* o reactivare spontană a acetilcolinesterazei, fapt care ar duce la subestimarea activității de inhibitor de AChE a substanței.

Autopsia

Autopsia tuturor animalelor (sacrificii prevăzute sau impuse de starea animalului) trebuie să includă o examinare a aspectului creierului și a măduvei spinării.

Examinarea histopatologică

Țesuturile nervoase ale tuturor animalelor care au supraviețuit după perioada de observație și care nu au fost utilizate pentru măsurări biochimice, trebuie să fie supuse unui examen microscopic. Țesuturile trebuie fixate *in situ* prin tehnica perfuziei. Secțiunile sunt practicate la nivelul cerebelului (pe plan longitudinal mediu), al bulbului rahidian, al măduvei spinării și al nervilor periferici. Secțiunile din măduva spinării sunt practicate pe segmentul cervical superior, în regiunea toracică medie și în regiunea lombo-sacrală. Se vor efectua secționări și în partea distală al nervului tibial, la nivelul ramurilor acestuia spre mușchii gastrocnemieni, precum și la nivelul nervului sciatic. Secțiunile sunt colorate cu ajutorul unor coloranți adecvați, specifici mielinei și axonilor.

2. **DATE**

De regulă, rezultatele obținute pentru diferitele criterii de evaluare reținute (biochimice, histopatologice și cele referitoare la examinarea comportamentului) sunt negative, în mod normal, nu mai este nevoie să se recurgă la teste de neurotoxicitate întârziată. Rezultatele ambigue sau neconcludente pot impune continuarea studiului.

Datele sunt indicate pentru fiecare animal separat. Pe lângă aceasta, datele sunt incluse într-un tabel care va indica la fiecare grup experimental, numărul de animale prezente la începutul testului, numărul de animale care prezintă leziuni, anomalii de comportament sau modificări biochimice, tipul și gravitatea leziunilor sau tulburărilor, precum și procentajul de animale care prezintă fiecare tip de leziuni sau tulburări, la diferite niveluri de gravitate.

▼B

Rezultatele acestui studiu trebuie evaluate din punct de vedere al incidenței lor asupra efectelor comportamentale, biochimice și histopatologice sau asupra oricărui alt efect observat la grupurile experimentale și cele martor sau din punct de vedere al gravității acestora și al corelării dintre ele.

Rezultatele cifrice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și recunoscute. Metoda statistică trebuie să fie aleasă cu ocazia elaborării studiului.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare va conține, pe cât posibil, următoarele informații:

3.1. Animale de experiență:

— linia pură utilizată;

— numărul animalelor, vârsta, sexul;

— originea, condiții de adăpostire etc.;

— greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

3.2. Condiții de testare:

— detalii cu privire la prepararea substanței testate și la stabilitatea și omogenitatea preparatului, dacă este posibil;

— justificarea alegerii vehiculului;

— detalii cu privire la administrarea substanței testate;

— detalii asupra calității hranei și a apei;

— justificarea alegerii dozei;

— specificarea dozelor administrate, cu indicații detaliate cu privire la vehicul, la volumul și starea de agregare a substanței administrate;

— eventual, identitatea agentului protector utilizat și detalii cu privire la administrarea acestuia.

3.3. Rezultate:

— informații cu privire la greutatea corporală;

— informații cu privire la reacția toxică pe grupuri, inclusiv mortalitatea;

— natura, gravitatea și durata efectelor clinice observate (eventual, reversibilitatea acestora);

— descrierea detaliată a metodelor și rezultatelor biochimice;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;

— prelucrare statistică a rezultatelor, după caz.

Evaluarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 418 a OCDE.

▼B

B.38. NEUROTOXICITATE ÎNTÂRZIATĂ A SUBSTANȚELOR ORGANOFOSFORICE – STUDIU CU ADMINISTRARE ÎN MOD REPETAT PE O DURATĂ DE 28 DE ZILE

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Atunci când se face evaluarea efectelor toxice ale unor substanțe, este important să se studieze capacitatea pe care o prezintă unele substanțe de a provoca anumite tipuri de neurotoxicitate pe care alte tipuri de studii nu ar putea să le evidențieze. Unii compuși organofosforici prezintă o neurotoxicitate întârziată și trebuie să fie supuși unor asemenea studii.

Teste de depistare *in vitro* pot fi utilizate în vederea identificării substanțelor care ar putea provoca o polineuropatie întârziată; cu toate acestea, rezultatele negative în urma unor teste *in vitro* nu sunt suficiente pentru a demonstra că substanța testată nu este neurotoxică.

Acest test de neurotoxicitate întârziată pe o durată de 28 de zile furnizează informații despre eventualele riscuri pentru sănătate, ca urmare a unor expuneri repetate în cursul unei perioade determinate. Acest test furnizează informații asupra relației doză-efect, precum și o estimare a nivelului dozei care nu are efecte nefaste detectabile și care poate fi utilă la stabilirea criteriilor de securitate în cazul unei expuneri.

A se vedea, de asemenea, introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIȚII

Substanțele organofosforice includ esteri, tioesteri organofosforici neîncărcați sau anihidrați ale acizilor organofosforici, organofosfonici sau organofosforamidici sau ale acizilor fosforotioci, fosfonotioci sau fosforotioamidici din aceeași clasă sau ale altor substanțe care pot provoca neurotoxicitatea întârziată detectabilă câteodată la substanțele din această clasă.

Neurotoxicitatea întârziată este un sindrom asociat cu instalarea prelungită a unei ataxii întârziate, asociate cu axonopatii distale la nivelul măduvei spinării și a nervilor periferici și cu o inhibare și o îmbătrânire a esterazei caracteristică neuropatiilor (neuropathy target esterase – NTE) în țesuturile nervoase.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța testată se administrează pe cale orală, timp de 28 de zile, unor găini de casă. Animalele sunt observate cel puțin o dată zilnic, până în a 14-a zi după administrarea ultimei doze, în vederea detectării tulburărilor de comportament, a unei ataxii sau a unei paralizii. Sunt efectuate măsurări biochimice, în special pentru evidențierea inhibării esterazei NTE, pe găinile selecționate aleator din fiecare lot, în general la 24 și la 48 de ore după ultima administrare. La două săptămâni după ultima administrare, găinile care au mai rămas sunt sacrificate și se efectuează examinarea histopatologică a țesuturilor nervoase selecționate.

▼B

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Pregătirea testului**

Găini adulte tinere, fără afecțiuni virale supuse unor tratamente care pot intra în interferență cu substanța testată și care nu prezintă tulburări ale aparatului locomotor, sunt distribuite aleator în grupuri experimentale și în loturi martor și sunt lăsate să se aclimatizeze la condițiile de laborator, cel puțin cu cinci zile înaintea începerii testului.

Cuștile sau incintele sunt destul de voluminoase pentru a permite o mișcare liberă găinilor, astfel încât mersul lor să poată fi observat ușor.

Substanța testată va fi administrată zilnic, șapte zile din șapte, pe cale orală, prin gavaj sau prin capsule de gelatină. Substanțele lichide pot fi administrate în mod direct sau dizolvate într-un vehicul adecvat, cum ar fi uleiul de porumb; substanțele solide trebuie dizolvate, dacă este posibil, altfel se poate întâmpla ca importante cantități de substanțe solide administrate în capsule de gelatină să nu fie absorbite în mod corespunzător. Dacă vehiculul este altul decât apa, caracteristicile sale toxice trebuie să fie cunoscute sau, în caz contrar, trebuie determinate înaintea începerii testului.

1.4.2. **Condiții de testare**

Animalele de experiență

Specia recomandată este găina domestică ouătoare adultă și tânără, de o vârstă cuprinsă între 8-12 luni (*Gallus gallus domesticus*). Se folosesc rase și linii pure de mărime standard; în mod normal, găinile folosite au fost crescute în condiții care le-au permis mișcarea liberă.

Număr și sex

Ca regulă generală, se lucrează cu cel puțin trei grupuri experimentale și un lot martor căreia i se administrează doar vectorul. Grupul căreia i se administrează doar vectorul, va fi tratat la fel ca și grupul experimental, singura excepție constând în administrarea substanței testate.

Trebuie selecționat un număr suficient de ridicat de animale în fiecare grup, astfel încât să se poată sacrifica cel puțin șase găini în vederea efectuării măsurărilor biochimice (trei la ambele prelevări) și astfel încât să supraviețuiască cel puțin șase după perioada de observație de după tratament de 14 zile.

Doze

Dozele trebuie selecționate ținându-se de cont de rezultatele unui test de neurotoxicitate întârziată după expunere acută și de orice alte informații disponibile cu privire la toxicitatea sau la cinetica substanței testate. Se selecționează doza cea mai ridicată, astfel încât aceasta să producă efecte toxice și de preferință o neurotoxicitate întârziată, fără să ducă însă la moarte sau la suferințe intense. După aceasta se definesc o serie de doze descrescătoare, astfel încât să se evidențieze o eventuală relație doză-efect, precum și o doză minimă fără niciun efect detectabil.

▼B

Testul-limită

Atunci când un test efectuat pe baza metodelor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă informațiile relevante despre substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea acestora, nu este necesară efectuarea unui studiu la o doză mai ridicată. Testul-limită este justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate.

Perioada de observație

Toate animalele sunt observate cel puțin o dată zilnic, în timpul expunerii și în următoarele 14 zile, dacă nu este programată sacrificarea lor în vederea efectuării autopsiei.

1.4.3. **Mod de lucru**

Substanța testată se administrează zilnic, șapte zile din șapte, timp de 28 de zile.

Observații generale

Observațiile încep imediat după expunere. Toate găinile sunt observate cu atenție cel puțin o dată pe zi, în timpul celor 28 de zile de tratament și în cursul celor 14 zile după ultima administrare sau până în data sacrificării. Sunt notate toate manifestările de toxicitate, data apariției, tipul, gravitatea și durata lor. Observația are în vedere tulburările de comportament, dar nu trebuie să se limiteze la acestea. Ataxia va fi măsurată cu ajutorul unei scale de evaluare obișnuite cu cel puțin patru niveluri; paralizia trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe săptămână găinile sunt scoase din cuști și supuse unei activități locomotorii forțate, cum ar fi de exemplu urcarea pe scară, astfel încât să se faciliteze examinarea manifestării efectelor toxice ușoare. Animalele muribunde sau cele care prezintă semne de suferință sau dureri intense trebuie excluse imediat din studiu, eutanasiate și supuse autopsiei.

Greutate corporală

Toate găinile sunt cântărite cu puțin înaintea primei administrări a substanței, după care cel puțin o dată pe săptămână.

Biochimie

Șase găini selecționate aleator din fiecare grup experimental și din grupurile martor cărora li se administrează doar vectorul, sunt sacrificate câteva zile după ultima administrare; creierul și măduva spinării din zona lombară se prepară și se analizează în vederea detectării inhibării esterazei caracteristice neuropatiilor (NTE). Pe lângă aceasta, poate să fie necesară și analiza inhibării acestei esteraze pe nervul sciatic. În general, sunt sacrificate trei găini din lotul martor și din fiecare grup experimental, 24 de ore după ultima administrare și alte trei, după alte 24 de ore, și anume 48 de ore după ultima administrare; dacă pe baza rezultatelor studiului prin expunere acută sau ale altor studii (studiul toxicocinetic, de exemplu) se consideră că ar fi indicată alegerea unor altor intervale de timp pentru sacrificii, acestea pot fi modificate în consecință cu condiția furnizării documentelor justificative.

Dacă este necesar, se pot efectua, de asemenea, măsurări de acetilcolinesterază (AChE) pe eșantioane. Cu toate acestea, poate avea loc *in vivo* o reactivare spontană a acetilcolinesterazei, fapt care ar duce la subestimarea activității de inhibitor de AChE a substanței.

▼B

Autopsia

Autopsia tuturor animalelor (sacrificii prevăzute sau impuse de starea animalului) trebuie să includă o examinare a aspectului creierului și a măduvei spinării.

Examinarea histopatologică

Țesuturile nervoase ale tuturor animalelor care au supraviețuit după perioada de observație și care nu au fost utilizate pentru măsurări biochimice, trebuie să fie supuse unui examen microscopic. Țesuturile trebuie fixate *in situ* prin tehnica perfuziei. Secțiunile sunt practicate la nivelul cerebelului (pe plan longitudinal mediu), al bulbului rahidian, al măduvei spinării și al nervilor periferici. Secțiunile la măduva spinării sunt practicate în segmentul cervical superior, în regiunea toracică medie și în regiunea lombo-sacrală. Se vor efectua secționări și în partea distală a nervului tibial și la nivelul ramurilor acestuia spre mușchii gemeni ai tricepsului, precum și la nivelul nervului sciatic. Secțiunile sunt colorate cu ajutorul unor coloranți adecvați, specifici mielinei și axonilor. Mai întâi, examinarea histopatologică va fi efectuată asupra țesuturilor conservate prelevate de la toate animalele din grupul experimental cărora li s-a administrat doza cea mai ridicată și din lotul martor. Dacă există efecte detectabile la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai ridicată, se va efectua un examen microscopic și asupra țesuturilor animalelor cărora li s-a administrat doza intermediară, respectiv doza cea mai scăzută.

2. **DATE**

De regulă, dacă rezultatele obținute pentru diferitele criterii de evaluare reținute la această metodă (biochimice, histopatologice și cele referitoare la comportament) sunt negative, nu mai este nevoie să se recurgă la teste de neurotoxicitate întârziată. Rezultatele ambigue sau neconcludente pot impune continuarea studiului.

Datele sunt indicate pentru fiecare animal individual. Pe lângă aceasta, datele sunt incluse într-un tabel care va indica la fiecare grup experimental, numărul de animale prezente la începutul testului, numărul de animale care prezintă leziuni, anomalii de comportament sau modificări biochimice, tipul și gravitatea acestor leziuni sau simptome, precum și procentajul de animale care prezintă fiecare tip de leziuni sau simptome la diferite niveluri de gravitate.

Rezultatele acestui studiu trebuie evaluate din punct de vedere al incidenței lor asupra efectelor comportamentale, biochimice și histopatologice sau asupra oricărui alt efect observat la grupurile experimentale și cele martor sau din punct de vedere al gravității acestora și al corelării dintre ele.

Rezultatele cifrice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și recunoscute. Metoda statistică va fi aleasă cu ocazia elaborării studiului.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare va conține, dacă este posibil, următoarele informații:

3.1. Animale de experiență:

— linia pură utilizată;

— numărul animalelor, vârsta;

— originea, condiții de adăpostire etc.;

— greutatea corporală a fiecărui animal la începutul testului.

▼B

3.2. Condiții de testare:

— detalii cu privire la prepararea substanței testate și la stabilitatea și omogenitatea preparatului, dacă este posibil;

— justificarea alegerii vehiculului;

— detalii cu privire la administrarea substanței testate;

— detalii asupra calității hranei și a apei;

— justificarea alegerii dozei;

— specificarea dozelor administrate, cu indicații detaliate cu privire la vehicul, la volumul și la starea de agregare a substanței administrate;

— dacă măsurările biochimice nu sunt efectuate la 24 și 48 de ore după ultima administrare, justificarea alegerii intervalelor de timp practicate.

3.3. Rezultate:

— informații cu privire la greutatea corporală;

— informații cu privire la reacția toxică pe grupuri, inclusiv mortalitatea;

— nivelul dozei fără efect nefast detectat;

— natura, gravitatea și durata efectelor clinice detectate (eventual, reversibilitatea acestora);

— descrierea detaliată a metodelor și rezultatelor biochimice;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor rezultatelor histopatologice;

— prelucrare statistică a rezultatelor, după caz.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

Această metodă corespunde Orientării 419 a OCDE.

▼B

B.39. TEST *IN VIVO* DE SINTEZĂ NEPROGRAMATĂ A ADN (UDS) PE CELULE HEPATICE DE MAMIFERE

1. METODĂ

Prezenta metodă este reprodusă după Orientarea 486 a OCDE, Testul *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere (1997).

1.1. INTRODUCERE

Scopul testului *in vivo* de sinteză neprogramată a ADN (UDS) pe celule hepatice de mamifere este identificarea substanţelor de testat care induc regenerarea ADN în celulele hepatice ale animalelor (1) (2) (3) (4).

Prezentul test *in vivo* oferă o metodă pentru studiul efectelor genotoxice ale produselor chimice în ficat. Efectul măsurat este o indicaţie a deteriorării ADN şi a regenerării ulterioare a acestuia în celulele hepatice. Ficatul este, de obicei, principalul loc de metabolism al compuşilor absorbiţi. De aceea, este un loc corespunzător pentru determinarea *in vivo* a degradării ADN.

Dacă există dovezi că substanţa de testat nu ajunge la ţesutul ţintă, nu este indicată utilizarea prezentului test.

Sinteza neprogramată a ADN (UDS) se determină prin încorporarea nucleozidelor marcate în celulele care nu suferă o sinteză programată (faza S) a ADN. Metoda utilizată cel mai frecvent constă în determinarea prin autoradiografie a timidinei marcate cu tritiu ^{3}H-TdR) care a fost încorporată. Pentru testele *in vivo,* USD se preferă utilizarea ficatului de şobolan. Se pot utiliza şi alte ţesuturi, dar acestea nu constituie obiectul prezentei metode.

Detectarea unui răspuns UDS depinde de numărul de baze din ADN excizate şi înlocuite la locul modificării. Prin urmare testul UDS este valoros în special pentru detectarea regenerării secvenţelor lungi (20-30 de baze) induse de substanţă. Spre deosebire de acestea, pentru detectarea regenerării secvenţelor scurte (1-3 baze) este necesară o sensibilitate mult mai mică. În plus, datorită nereparării, unei reparări eronate sau a unei replicări eronate a leziunilor din ADN, pot apărea fenomene mutagene. Amploarea răspunsului UDS nu oferă nicio indicaţie despre fidelitatea procesului de regenerare. În plus, este posibilă reacţia unui mutagen cu ADN, fără ca modificarea ADN rezultată să poată fi remediată printr-un proces de reparare prin excizie. În testul UDS, lipsa informaţiilor specifice privind activitatea mutagenă este compensată de sensibilitatea potenţială a acestui efect, care se poate măsura în totalitatea genomului.

A se vedea şi introducerea generală partea B.

1.2. DEFINIŢII

Celule în curs de reparare: număr net de grăunţi nucleari (NNG) mai mare decât o valoare prestabilită, ce trebuie justificată de laboratorul care realizează testul.

Număr net de grăunţi nucleari (NNG): măsură cantitativă a activităţii UDS a celulelor în testele autoradiografice UDS, calculată prin scăderea numărului mediu de grăunţi citoplasmici din zonele citoplasmice echivalente nucleului (CG) din numărul de grăunţi nucleari (NG): NNG = NG – CG. NNG se calculează pentru celulele individuale, iar apoi se extrapolează pentru celulele dintr-o cultură, din culturi paralele etc.

▼B

Sinteza neprogramată a ADN (UDS): sinteza reparării ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul *in vivo* UDS pe celule hepatice de mamifere indică o sinteză de reparare a ADN după excizia și eliminarea unui fragment din ADN, ce conține o regiune deteriorată indusă de acțiunea unor substanțe chimice sau a unor agenți fizici. Testul se întemeiază, de obicei, pe încorporarea ^{3}H-TdR în ADN-ul celulelor hepatice care prezintă o frecvență redusă de celule în faza S a ciclului celular. Încorporarea ^{3}H-TdR se determină, de obicei, prin autoradiografie, deoarece această tehnică nu este sensibilă la interferența cu celulele în fază S, așa cum este, de exemplu, numărătoarea în scintilație lichidă.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Pregătirea testului**

1.4.1.1. *Selectarea speciei de animale*

Se utilizează, de obicei, șobolani, deși se poate utiliza orice specie de mamifere. Se recomandă utilizarea unor animale adulte tinere sănătoase din sușe folosite în mod curent în laborator. La începutul studiului, greutatea animalelor ar trebui să prezinte variații minime, ce nu trebuie să depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

1.4.1.2. *Condițiile de adăpostire și de hrănire*

Se aplică condițiile generale menționate în introducerea generală partea B, dar umiditatea atinsă ar trebui să fie de 50-60 %.

1.4.1.3. *Pregătirea animalelor*

Animalele adulte tinere sănătoase se distribuie în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Cuștile ar trebui să se aranjeze astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. Animalele sunt identificate individual și se țin în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

1.4.1.4. *Substanța de testat/Preparare*

Substanțele de testat în stare solidă ar trebui să se preparare sub formă de soluții sau suspensii în solvenții sau vehiculele corespunzătoare și să se dilueze, dacă este cazul, înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele de testat lichide se pot administra direct sau dilua înainte de administrare. Se recomandă utilizarea preparatelor proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în caz de păstrare.

1.4.2. **Condițiile de testare**

1.4.2.1. *Solventul/vehiculul*

Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la dozele utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Utilizarea altor solvenți/vehicule decât cele recunoscute ar trebui să fie justificată cu date care să demonstreze compatibilitatea acestora. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se prefere utilizarea unui solvent/vehicul apos.

▼B

1.4.2.2. *Martorii*

Martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul) utilizați în paralel ar trebui să se includă în fiecare parte a experimentului, realizată independent. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, manipularea animalelor din grupele martor ar trebui să fie identică cu cea a animalelor din grupele tratate.

Martorii pozitivi ar trebui să fie substanțe despre care se știe că produc UDS atunci când se administrează în doze de expunere estimate a genera o creștere detectabilă în raport cu fondul. Martorii pozitivi care necesită o activare metabolică ar trebui să se utilizeze în doze care provoacă un răspuns moderat (4). Dozele se pot alege astfel încât să se obțină efecte clare, dar fără să releve imediat examinatorului identitatea lamelelor codificate. În tabelul următor se prezintă exemple de substanțe care se pot utiliza ca martori pozitivi:

Momentele de prelevare a probelor	Substanța	Nr. CAS	Nr. EINECS
Primele prelevări (2-4 ore)	N-nitrozodimetilamină	62-75-9	200-249-8
Ultimele prelevări (12-16 ore)	N-2-fluorenilacetamidă (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Se pot utiliza și alte substanțe corespunzătoare ca martori pozitivi. Martorul pozitiv ar trebui să se administreze pe o cale diferită de cea pentru substanța de testat.

1.5. MOD DE LUCRU

1.5.1. **Numărul și sexul animalelor**

Ar trebui să se utilizeze un număr suficient de animale pentru a ține seama de variația răspunsului testului în funcție de natura biologică. Ar trebui să se utilizeze un număr de minimum trei animale analizabile din fiecare grupă. Dacă în momentul studiului există date acumulate din experimentele anterioare, sunt necesare doar unul sau două animale pentru grupele de martorii pozitivi și negativi analizate în paralel.

Dacă în momentul studiului există date disponibile din studii pe aceleași specii, în care s-a folosit aceeași cale de expunere, care să demonstreze lipsa unor diferențe substanțiale de toxicitate între sexe, atunci va fi suficientă testarea pe animale de un singur sex, de preferință de sex masculin. Dacă expunerea umană la produse chimice este specifică sexului, ca în cazul unor produse farmaceutice, testul ar trebui să se realizeze pe animale de sexul corespunzător.

1.5.2. **Modalitatea de tratare**

Substanțele se administrează în general într-o singură repriză.

1.5.3. **Dozele**

În mod normal, se utilizează minimum două doze diferite. Doza maximă se definește ca doza ce produce astfel de semne de toxicitate, încât dozele mai mari, administrate în același mod, se estimează că sunt letale. În general, doza mai mică trebuie să fie egală cu 50 % până la 25 % din doza mare.

▼B

Substanțele cu activitate biologică specifică la doze mici netoxice (ca hormonii și mitogenii) pot să facă excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și ar trebui evaluate pentru fiecare caz în parte. Dacă, în lipsa datelor corespunzătoare, se realizează un studiu pentru stabilirea dozelor, acesta ar trebui să se realizeze în același laborator și să utilizeze aceeași specie, aceeași sușă de animale de același sex și regimul de tratare să fie același ca cel ce urmează să fie utilizat în studiul principal.

Doza maximă se mai poate defini ca doza care produce anumite semne de toxicitate în ficat (de exemplu nuclee picnotice).

1.5.4. **Testul-limită**

Dacă un test realizat cu o doză de minimum 2 000 mg/kg greutate corporală, administrată într-o singură repriză sau în două reprize în aceeași zi, nu produce efecte toxice detectabile și dacă o genotoxicitate este improbabilă pe baza datelor referitoare la substanțe cu o structură apropiată, se poate considera că un studiu complet nu este necesar. În funcție de expunerea umană preconizată, ar putea fi necesară o doză mai mare în testul limită.

1.5.5. **Administrarea dozelor**

Substanța de testat se administrează, de obicei, prin cavitatea nazală cu ajutorul unui tub stomacal sau a unei canule de intubație adaptate. Se pot accepta și alte căi de administrare, dacă se pot justifica. Cu toate acestea, calea intraperitoneală nu se recomandă, deoarece probabilitatea de expunere a ficatului este mai mare decât la administrarea prin intermediul sistemului circulator. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin sondă gastrică introdusă prin cavitatea nazală sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul ar trebui să fie mai mic sau egal cu 2 ml/100 g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât cel menționat ar trebui să se justifice. Cu excepția substanțelor iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant pentru toate dozele.

1.5.6. **Prepararea celulelor hepatice**

Prelevarea celulelor hepatice de la animalele tratate se realizează, de obicei, după 12-16 ore de la administrarea dozei. În general, mai este necesară o prelevare (de obicei, după 2-4 ore de la tratament), cu excepția cazului în care există un răspuns pozitiv net după 12-16 ore. Cu toate acestea, se pot utiliza și alte momente de prelevare, dacă datele toxicokinetice justifică acest lucru.

Culturile pe termen scurt de celule hepatice de mamifere se realizează, de obicei, perfuzând ficatul *in situ* cu colagenază și lăsând celulele hepatice proaspăt disociate să se fixeze pe o suprafață corespunzătoare. Celulele hepatice de la animale martori negativi ar trebui să aibă o viabilitate (5) de minimum 50 %.

1.5.7. **Determinarea UDS**

Celulele hepatice proaspăt izolate se supun în general incubării într-un mediu, ce conține ^{3}H-TdR, pentru o perioadă de timp corespunzătoare, de exemplu 3-8 ore. La încheierea perioadei de incubare, ar trebui ca mediul să fie îndepărtat de pe celule, care pot să fie incubate apoi într-un mediu ce conține timidină nemarcată în exces, pentru diminuarea radioactivității neîncorporate („cold chase”). Celulele sunt apoi spălate, fixate și uscate. Pentru perioade de incubare mai lungi, s-ar putea ca procedeul „cold chase” să nu fie necesar. Lamelele sunt imersate în soluție autoradiografică, păstrate la întuneric (de exemplu refrigerate timp de 7-14 zile), developate, colorate și apoi se procedează la numărarea grăunților de argint expuși. Pentru fiecare animal se pregătesc două până la trei lamele.

▼B

1.5.8. **Analiza**

Preparatele depuse pe lamele ar trebui să conțină un număr suficient de celule cu o morfologie normală, pentru a permite o evaluare semnificativă a UDS. Preparatele se examinează la microscop pentru identificarea semnelor de citotoxicitate evidentă (de exemplu picnoză, diminuarea nivelului de marcaj radioactiv).

Se recomandă codificarea lamelelor înainte de numărătoarea grăunților. În general, pentru fiecare animal se identifică 100 de celule pe minimum două lamele; numărătoarea unui număr de celule mai mic de 100 pentru fiecare animal ar trebui justificată. Numărul de grăunți nu se determină pentru nucleele în fază S, dar se poate înregistra proporția de celule în faza S.

Cantitatea de ^{3}H-TdR încorporată în nuclee și citoplasma celulelor normale din punct de vedere morfologic, puse în evidență prin depunerea de grăunți de argint, ar trebui să se determine prin metode corespunzătoare.

Numărul grăunților se determină pe baza nucleelor (grăunți nucleari, NG), iar zonele echivalente nucleului se determină pe baza citoplasmei (grăunți citoplasmici, CG). Numărul CG se obține măsurând fie zona cea mai marcată a citoplasmei, fie media a două sau trei numărători de grăunți citoplasmici adiacenți nucleului. Se pot folosi și alte metode de numărare (de exemplu numărarea celulelor complete), în măsura în care acestea pot fi justificate (6).

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Ar trebui să se prezinte date pentru fiecare lamelă și pentru fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să se prezinte sub formă de tabel. Numărul net de grăunți nucleari (NNG) ar trebui să se calculeze pentru fiecare celulă, pentru fiecare animal și pentru fiecare doză și moment de prelevare prin scăderea numărului CG din numărul NG. Dacă se face numărătoarea „celulelor în curs de reparare”, ar trebui să se justifice criteriile folosite la definirea „celulelor în curs de reparare”, care ar trebui să se întemeieze pe datele obținute din experimentele anterioare sau pe datele obținute pe martori negativi testați în paralel. Pentru evaluarea rezultatelor numerice se pot utiliza metode statistice. În acest caz, ar trebui, înaintea realizării studiului, să se selecteze și să se justifice testele statistice.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Exemplele de criterii de răspunsuri pozitive/negative includ:

pozitiv
(i) valori ale NNG mai mari de o valoare-prag stabilită, care se justifică prin datele obținute în laborator în experimente anterioare; sau

(ii) valori ale NNG cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel;

negativ
(i) valori ale NNG egale cu/mai mici decât valoarea-prag pentru martor, rezultată din experimente anterioare; sau

(ii) valori ale NNG care nu sunt cu mult mai mari decât cele pentru martorul analizat în paralel.

▼B

Ar trebui să se aibă în vedere relevanța biologică a rezultatelor, și anume ar trebui să se țină seama de parametri ca variația între animale, relația doză-răspuns și citotoxicitatea. Pentru evaluarea rezultatelor testelor se poate recurge și la ajutorul unor metode statistice. Semnificația statistică nu ar trebui să fie totuși singurul factor determinant pentru a decide cu privire la un răspuns pozitiv.

Deși majoritatea experimentelor vor da în mod clar rezultate pozitive sau negative, în anumite cazuri rare, datele stabilite vor exclude posibilitatea unei concluzii definitive cu privire la activitatea substanței de testat. Rezultatele pot să rămână nesigure sau discutabile independent de numărul de repetări ale experimentului.

Un rezultat pozitiv al unui test UDS *in vivo* pe celule hepatice de mamifere indică faptul că substanța de testat produce leziuni *in vivo* ale ADN din celulele hepatice ale mamiferelor, care se pot remedia prin sinteza neprogramată a ADN *in vitro*. Un rezultat negativ indică faptul că, în condițiile de testare, substanța de testat nu produce o deteriorare a ADN care să se poată detecta prin prezentul test.

Ar trebui să se discute probabilitatea ca substanța de testat să ajungă în circulația generală sau la țesutul țintă (de exemplu toxicitatea sistemică).

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Solventul/vehiculul:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Animalele de laborator:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grupă.

Condițiile de testare:

— martorii pozitivi și negativi vehicul/solvent;

— datele din studiul pentru stabilirea dozelor, dacă s-a realizat;

— justificarea alegerii dozelor utilizate;

— detalii privind prepararea substanței de testat;

— detalii privind modalitatea de administrare selectată;

— justificarea căii de administrare alese;

— metode de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în circulația generală sau în țesutul țintă, dacă este cazul;

▼B

— conversia concentrației substanței de testat (ppm) în hrană/apa de băut în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei;

— descrierea amănunțită a modalităților de tratare și de prelevare a probelor;

— metodele de măsurare a toxicității;

— metoda de preparare și de cultură a celulelor hepatice;

— metoda autoradiografică utilizată;

— numărul de lamele preparate și numărul de celule numărate;

— criteriile de evaluare;

— criteriile utilizate la caracterizarea studiilor ca fiind pozitive, negative sau nesigure.

Rezultatele:

— valorile medii ale numărului de grăunți nucleari, grăunți citoplasmatici și ale numărului net de grăunți nucleari pentru fiecare lamelă, fiecare animal și fiecare grupă;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— evaluarea statistică, dacă există;

— semnele de toxicitate;

— datele privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi studiați în paralel;

— datele anterioare privind martorii negativi (solvent/vehicul) și pozitivi, cu domeniile, valorile medii și deviațiile standard;

— numărul de celule „în curs de reparare”, dacă s-a determinat;

— numărul de celule în faza S, dacă s-a determinat;

— viabilitatea celulelor.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

2. Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123-133.

3. Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

4. Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, Mutations Res., 312, pp. 263-285.

5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo*/*In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

6. Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo*/*In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼M8

B.40. COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODA DE TESTARE PRIVIND REZISTENȚA ELECTRICĂ TRANSCUTANATĂ (RET)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 430 (2015). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în epidermă, ajungând în dermă, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare B.40 actualizată asigură o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU (1) și cu Regulamentul CLP.

2. Evaluarea corozivității cutanate a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea nr. 404 a OCDE adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (2). În plus față de MT B.40, au fost validate și adoptate alte metode de testare *in vitro* pentru testarea potențialului de coroziune cutanată ale substanțelor chimice ca MT B.40bis (echivalentă cu Orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și MT B.65 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 435 a OCDE) (4), care pot, de asemenea, să identifice subcategorii de produse chimice corozive atunci când este necesar. Au fost adoptate mai multe metode de testare *in vitro* validate ca MT B.46 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 439) a OCDE (5), pentru testarea iritației cutanate. Un document de orientare privind metodele integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează diverse surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (6).

3. Prezenta metodă de testare abordează coroziunea cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta se bazează pe metoda de testare a rezistenței electrice transcutanate (RET) pe piele de șobolan, care utilizează discuri de piele pentru identificarea substanțelor corozive prin capacitatea lor de a produce o pierdere a integrității normale a stratului cornos și a funcției de barieră. Orientarea OCDE aferentă privind testarea a fost adoptată inițial în 2004 și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA.

4. Pentru a evalua testele de coroziune cutanată *in vitro* în scopuri de reglementare, au fost realizate studii de pre-validare (7), urmate de un studiu de validare formală a metodei de testare a RET pe piele de șobolan pentru evaluarea coroziunii cutanate (8) (9) (10) (11). Rezultatul acestor studii a

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

condus la recomandarea că metoda de testare a RET (desemnată drept metoda de referință validată – MRV) ar putea fi utilizată în scopuri de reglementare pentru evaluarea corozivității cutanate *in vivo* (12) (13) (14).

5. Înainte să se poată utiliza în scopuri de reglementare o metodă de testare RET *in vitro* similară sau modificată propusă pentru coroziunea cutanată, alta decât MRV, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acesteia pentru scopul propus al acesteia pentru a asigura similaritatea acesteia cu MRV în conformitate cu cerințele standardelor de performanță (PS) (15). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea OCDE aferentă privind testarea a oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță.

DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Un studiu de validare (10) și alte studii publicate (16) (17) au raportat că metoda de testare a RET pe piele de șobolan este în măsură să facă diferența între substanțele cunoscute ca fiind corozive și cele necorozive pentru piele, cu o sensibilitate totală de 94 % (51/54) și specificitate de 71 % (48/68), pentru o bază de date cu 122 de substanțe.

8. Această metodă de testare abordează coroziunea cutanată *in vitro*. Aceasta permite identificarea substanțelor chimice necorozive și corozive, în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP. O limitare a acestei metode de testare, astfel cum s-a demonstrat prin studiile de validare (8) (9) (10) (11), este aceea că aceasta nu permite subclasificarea substanțelor și amestecurilor corosive, în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP. Cadrul de reglementare aplicabil va determina modul în care va fi utilizată această metodă de testare. Deși această metodă de testare nu oferă informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 abordează în mod specific efectul iritației cutanate *in vitro*asupra sănătății (5). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte documentul de orientare al OCDE privind IATA (6).

9. În cadrul procesului de validare a acestei metode de testare a fost testată o gamă largă de substanțe chimice reprezentând în principal substanțe, iar baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă 60 de substanțe chimice în total dintr-o gamă largă de clase de substanțe chimice (8) (9). Pe baza datelor generale disponibile, metoda de testare este aplicabilă pentru o gamă largă de clase de substanțe chimice și stări fizice, inclusiv lichide, semisolide, solide și ceruri. Însă, întrucât pentru anumite stări fizice nu sunt disponibile elemente de testare cu date de referință adecvate, ar trebui remarcat faptul că, în timpul validării, au fost evaluate un număr comparativ redus de ceruri și substanțe solide corozive. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a metodei de testare la o anumită categorie de substanțe, metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie de substanțe. În plus, se presupune că această metodă de testare este aplicabilă pentru amestecuri ca o extindere a aplicabilității sale la substanțe. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri (de exemplu, în urma unei strategii propuse de Eskes *et al.*, 2012) (18), metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există

▼M8

o cerință normativă pentru testarea amestecului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul studiilor de validare (8) (9). Deși se poate concepe faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul metodei de testare RET, actuala metodă de testare nu permite testarea gazelor și a aerosolilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

10. Substanța chimică de testat este aplicată timp de maxim 24 de ore pe suprafețele epidermice ale discurilor de piele într-un sistem de testare cu două compartimente, în care discurile de piele funcționează ca separație între compartimente. Discurile de piele sunt prelevate de la șobolani cu vârste cuprinse între 28 și 30 de zile, care au fost eutanasiați. Substanțele chimice corozive sunt identificate după capacitatea lor de a produce o pierdere a integrității normale a stratului cornos și a funcției de barieră, care este măsurată ca o micșorare a RET sub nivelul de prag (16) (a se vedea punctul 32). Pentru testarea RET a pielii de șobolan a fost aleasă o valoare-limită de 5 kΩ, pe baza numeroaselor date referitoare la o gamă largă de substanțe, în care marea majoritate a valorilor au fost în mod clar cu mult peste (deseori > 10 kΩ) sau cu mult sub (deseori < 3 kΩ) această valoare (16). În general, substanțele chimice de testat care sunt necorozive pentru animale, dar sunt iritante sau neiritante, nu reduc RET sub această valoare-limită. Mai mult decât atât, utilizarea altor preparate de piele sau a altor echipamente poate modifica valoarea-limită, necesitând o validare ulterioară.

11. În procedura de testare este introdusă o etapă de fixare a unui colorant pentru testarea în vederea confirmării rezultatelor pozitive ale RET care prezintă valori apropiate de 5 kΩ. Această etapă de fixare a unui colorant determină dacă creșterea permeabilității ionice are loc datorită distrugerii fizice a stratului cornos. Metoda RET, în care s-a utilizat piele de șobolan, s-a demonstrat a fi anticipativă pentru coroziunea *in vivo* la iepure, evaluată prin MT B.4 (2).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

12. Înainte de utilizarea sistematică a metodei de testare a RET pe piele de șobolan, care respectă această metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare recomandate în tabelul 1. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (16)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare (1)

Substanță	NR CAS	Clasa chimică (2)	GHS al ONU/ CLP Cat. bazată pe rezultate *in vivo* (3)	MRV Cat. bazată pe rezultate *in vitro*	Stare fizică	pH (4)
Substanțe corozive *in vivo*						
N,N'-Dimetil dipropilentriamină	10563-29-8	bază organică	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diaminopropan	78-90-0	bază organică	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([2])	GHS al ONU/ CLP Cat. bazată pe rezultate *in vivo* ([3])	MRV Cat. bazată pe rezultate *in vitro*	Stare fizică	pH ([4])
Substanțe corozive *in vivo*						
Acid sulfuric (10 %)	7664-93-9	acid anorganic	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Hidroxid de potasiu (10 % soluție apoasă)	1310-58-3	bază anorganică	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Acid octanoic (caprilic)	124-07-2	acid organic	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terț-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Substanțe necorozive *in vivo*						
Acid izostearic	2724-58-5	acid organic	NC	6 × NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	bază organică	NC	6 × NC	S	5,5
Bromură de fenetil	103-63-9	electrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metiltio) -benzaldehidă	3446-89-7	electrofil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Decadienă	1647-16-1	substanță organică neutră	NC	6 × NC	L	3,9
Tetracloretilenă	127-18-4	substanță organică neutră	NC	6 × NC	L	4,5

Abrevieri: aq = apos; Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; MRV = Metodă de referință validată; C = coroziv; NC = necoroziv.

([1]) Substanțele de verificare, sortate mai întâi ca substanțe corozive/necorozive, apoi pe subcategorii de substanțe corozive și apoi pe clase de substanțe chimice, au fost selectate dintre substanțele utilizate în studiul de validare ECVAM a metodei de testare RET pe piele de șobolan (8) (9). Cu excepția cazului în care se indică altfel, substanțele au fost testate la nivelul de puritate obținut atunci când au fost achiziționate dintr-o sursă comercială (8). Selecția a inclus, în măsura posibilității, substanțe care: (i) sunt reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțe slab corozive și puternic corozive) pe care MRV poate să le măsoare sau să le estimeze; (ii) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiul de validare; (iii) reflectă caracteristicile de performanță ale MRV; (iv) au structuri chimice bine definite; (v) induc rezultate definitive în metoda de testare de referință *in vivo*; (vi) sunt disponibile în comerț; și (vii) nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive.

([2]) Clasa de substanțe chimice stabilită de Barratt *et al.* (8).

([3]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II și, respectiv, III pentru categoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU/ Regulamentul CLP.

([4]) Valorile pH-ului au fost obținute de la Fentem *et al.* (9) și Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCEDURA

13. Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru metoda de testare a coroziunii pielii prin RET pe piele de șobolan (19). Metodele de testare a RET pe piele de șobolan care fac obiectul prezentei metode de testare ar trebui să respecte următoarele condiții:

Animale

14. Ar trebui să se utilizeze șobolani, deoarece sensibilitatea pielii lor la substanțe, în prezenta metodă de testare, a fost demonstrată anterior (12) și este singura sursă de piele care a fost validată în mod oficial (8) (9). Vârsta (la care pielea este prelevată) și specia șobolanului sunt extrem de importante pentru a obține certitudinea că foliculii piloși sunt în stare latentă, înainte să înceapă creșterea părului adult.

15. Părul dorsal și de pe coaste al șobolanilor tineri de aproximativ 22 de zile, femele sau masculi (specia Wistar – comparabilă sau derivată), este îndepărtat cu grijă cu un clește mic. Apoi animalele sunt spălate prin ștergere atentă, iar zona fără păr este cufundată într-o soluție cu antibiotic (care conține de exemplu streptomicină, penicilină, cloramfenicol și amfotericin cu concentrații eficiente pentru inhibarea creșterii bacteriilor). Animalele sunt spălate încă o dată cu antibiotic în a treia sau a patra zi după prima spălare și sunt folosite în termen de trei zile după a doua spălare, atunci când stratul cornos s-a refăcut după îndepărtarea părului.

Pregătirea discurilor de piele

16. Animalele sunt eutanasiate fără durere la vârsta de 28-30 de zile; această vârstă este critică. Se îndepărtează pielea dorso-laterală a fiecărui animal și se desprinde grăsimea subcutanată în exces prin jupuirea cu grijă a acesteia de pe piele. Se prelevează discuri de piele cu un diametru de aproximativ 20 mm fiecare. Pielea poate fi păstrată înainte ca discurile să fie folosite, în cazurile în care se demonstrează că datele privind martorul negativ și pozitiv sunt echivalente cu cele obținute cu pielea proaspătă.

17. Fiecare disc de piele este așezat peste un capăt al unui tub PTFE (politetrafluoretilenă), asigurându-se că suprafața epidermei se află în contact cu tubul. Peste capătul tubului se așază prin apăsare un inel de cauciuc pentru a fixa pielea, iar excesul de țesut este tăiat. Apoi inelul de cauciuc este etanșat cu grijă la capătul tubului PTFE cu vaselină. Tubul este susținut de o clemă elastică în interiorul unei camere recipient care conține soluție de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). Discul de piele ar trebui scufundat în întregime în soluția de $MgSO_4$. Dintr-o singură piele de șobolan se pot obține 10-15 discuri de piele. Dimensiunile tubului și ale inelului sunt prezentate în figura 2.

18. Înainte de începerea testării, se măsoară RET pe două discuri de piele ca o procedură de control al calității pentru fiecare piele de animal. Ambele discuri ar trebui să aibă valorile rezistenței mai mari de 10 kΩ pentru ca restul discurilor să poată fi folosite pentru test. Dacă valoarea rezistenței este mai mică de 10 kΩ, discurile rămase din pielea respectivă ar trebui eliminate.

Aplicarea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

19. Pentru fiecare test (experiment) ar trebui utilizați martori pozitivi și negativi concomitent pentru a asigura performanța adecvată a modelului experimental. În cadrul fiecărui test (experiment) ar trebui să se utilizeze discuri de piele de la un singur animal. Substanțele chimice de testat martor pozitive și negative sugerate sunt acidul clorhidric 10 M și, respectiv, apă distilată.

▼M8

20. Substanțele chimice de testat lichide (150 µ) sunt aplicate uniform pe suprafața epidermei din interiorul tubului. Atunci când se testează materiale solide, pe disc se aplică o cantitate suficientă din substanța solidă, astfel încât întreaga suprafață a epidermei să fie acoperită. Peste substanța solidă se adaugă apă deionizată (150 µ), iar tubul este agitat ușor. Pentru a se obține un contact maxim cu pielea, substanțele solide ar trebui încălzite la 30 °C pentru ca substanțele chimice de testat să se topească sau să se înmoaie sau ar trebui să fie măcinate pentru a se obține granule sau pulbere.

21. Pentru fiecare test și substanță chimică martor se utilizează trei discuri de piele pentru fiecare test (experiment). Substanțele chimice de testat sunt aplicate pentru 24 de ore la 20-23 ° C. Substanța chimică de testat este îndepărtată prin spălare sub jet de apă de la robinet până la temperatura camerei, până când nu se mai pot îndepărta alte materiale.

Măsurători ale RET

22. Impedanța pielii se măsoară ca RET prin utilizarea unei punți Wheatstone de joasă tensiune și curent alternativ (18). Specificațiile generale ale punții sunt: tensiunea de lucru 1-3 V, curent alternativ sinusoidal sau dreptunghiular de 50-1000 Hz și un interval de măsurare de cel puțin 0,1-30 kΩ. Puntea de date folosită în studiul de validare a măsurat inductanța, capacitatea electrică și rezistența până la valori de 2 000 H, 2 000 µF și 2 MΩ la frecvențe de 100 Hz sau 1 kHz, utilizând valori în serie sau în paralel. Măsurătorile testului de corozivitate RET constau în înregistrarea rezistenței la o frecvență de 100 Hz utilizând valori în serie. Înainte de măsurarea rezistenței electrice, se micșorează tensiunea suprafeței pielii prin adăugarea unui volum suficient de etanol 70 % pentru a acoperi epiderma. După câteva secunde etanolul este îndepărtat din tub și apoi țesutul este hidratat prin adăugarea de 3 ml soluție $MgSO_4$ (154 mM). Electrozii punții sunt așezați pe ambele părți ale discului de piele pentru a măsura rezistența în kΩ/disc de piele (figura 1). Dimensiunile electrozilor și lungimea electrodului expus sub clemele-crocodil sunt prezentate în figura 2. În timpul măsurării rezistenței, clema atașată electrodului interior este așezată pe partea superioară a tubului PTFE pentru a se asigura că lungimea electrodului scufundat în soluția de $MgSO_4$ rămâne constantă. Electrodul exterior este introdus în interiorul compartimentului receptor astfel încât să se sprijine pe fundul compartimentului. Distanța dintre clema elastică și fundul tubului PTFE este menținută constantă (figura 2) deoarece această distanță influențează valoarea rezistenței obținute. Prin urmare, distanța dintre electrodul interior și discul de piele trebuie să fie constantă și minimă (1-2 mm).

23. Dacă valoarea rezistenței măsurate este mai mare de 20 kΩ, acest lucru se poate datora resturilor de substanță chimică de testat care acoperă suprafața epidermică a discului de piele. Se poate încerca o îndepărtare suplimentară a acestui strat depus, de exemplu prin acoperirea tubului PTFE cu degetul mare protejat cu o mănușă și agitarea acestuia timp de aproximativ 10 secunde; soluția de $MgSO_4$ este înlăturată și se repetă măsurarea rezistenței cu $MgSO_4$ proaspăt.

24. Proprietățile și dimensiunile aparatului de testare și ale procedurii experimentale utilizate pot influența valorile RET obținute. Pe baza datelor obținute utilizând aparatul specific și procedura descrisă în această metodă, s-a stabilit un prag de corozivitate de 5 kΩ. Dacă se modifică condițiile de testare sau dacă se folosește un alt aparat, valorile de control și de prag pot fi diferite. Prin urmare, este necesar să se etaloneze metodologia și valorile de prag ale rezistenței prin testarea unei serii de substanțe de performanță alese dintre substanțele utilizate pentru studiul de validare (8) (9) sau dintre clase de substanțe chimice similare cu substanțele studiate. În tabelul 1 se identifică un set de substanțe de verificare adecvate.

▼M8

Metode de fixare a unui colorant

25. Expunerea anumitor materiale necorozive poate duce la micşorarea rezistenței sub limita de 5 kΩ, permițându-se trecerea ionilor prin stratul cornos, ceea ce reduce rezistența electrică (9). De exemplu, substanțele organice neutre și substanțele care au proprietăți tensioactive (inclusiv detergenți, emulgatori și alți surfactanți) pot îndepărta lipidele pielii, făcând bariera cutanată mai permeabilă pentru ioni. Astfel, dacă, în absența unei deteriorări perceptibil vizibile a discurilor de piele, valorile RET generate de aceste substanțe chimice sunt de aproximativ 5 kΩ sau mai mici, ar trebui efectuată o evaluare a penetrării colorantului pentru țesuturile tratate și cele martor pentru a se determina dacă valorile RET obținute au constituit rezultatul unei permeabilități cutanate crescute sau al coroziunii cutanate (7) (9). În acest din urmă caz, în care stratul cornos este perturbat, colorantul sulforhodamină B, atunci când este aplicat pe suprafața pielii, pătrunde rapid și colorează țesutul de dedesubt. Acest colorant specific este stabil pentru o gamă largă de substanțe și nu este afectat de procedura de extracție descrisă mai jos.

Aplicarea și îndepărtarea colorantului sulforhodamină B

26. După efectuarea măsurătorilor RET, sulfatul de magneziu este îndepărtat din tub, iar pielea este examinată cu atenție pentru a se depista deteriorări evidente. În cazul în care nu există nicio vătămare evidentă gravă (de exemplu, perforare), se aplică o diluție de 150 µl de soluție de 10 % (g/v) în apa distilată a colorantului sulforhodamină B (acid roșu 52; C.I. 45100; număr CAS 3520-42-1) pe suprafața epidermei fiecărui disc de piele timp de 2 ore. Ulterior, aceste discuri de piele sunt spălate cu apă de la robinet la temperatura camerei, timp de aproximativ 10 secunde, pentru a îndepărta colorantul în exces/nefixat. Se scoate cu grijă fiecare disc de piele de pe tubul de PTFE și se introduce într-un flacon (de ex. un flacon scintilator din sticlă, de 20 ml) care conține apă deionizată (8 ml). Flacoanele sunt agitate ușor timp de cinci minute pentru a se îndepărta orice cantitate de colorant nefixat. Se repetă procedura de spălare, după care discurile de piele sunt scoase și așezate în flacoane care conțin 5 ml de dodecilsulfat de sodiu (SDS) 30 % (greutate/volum) în apă distilată și incubate la 60 °C în timpul nopții.

27. După incubare, fiecare disc de piele este scos și eliminat, iar soluția rămasă este centrifugată timp de 8 minute la 21 °C (forța centrifugală relativă ~ 175 × g). Un eșantion de supernatant de 1 ml este diluat într-o proporție de 1 la 5 (v/v) [și anume 1 ml + 4 ml] cu SDS 30 % (g/v) în apă distilată. Densitatea optică (DO) a soluției este măsurată la 565 nm.

Calcularea conținutului de colorant

28. Conținutul de colorant sulforhodamină B din fiecare disc se calculează din valorile DO (9) (coeficientul de extincție molară a colorantului sulforhodamină B la 565 nm = 8,7 × $l0^4$; greutatea moleculară = 580). Conținutul de colorant este determinat pentru fiecare disc de piele folosind o curbă caracteristică de etalonare, iar ulterior se calculează conținutul mediu de colorant pentru testele repetate.

Criterii de acceptabilitate

29. Valorile medii ale RET sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor pozitive și negative efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metoda în laboratorul de testare. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele acceptabile ale rezistenței sunt prezentate în următorul tabel:

▼**M8**

Substanță	martor	Interval de rezistență (kΩ)
Pozitivă	Acid clorhidric 10 M	0,5 - 1,0
Negativă	Apă distilată	10 - 25

30. Valorile medii de fixare ale colorantului sunt acceptate cu condiția ca valorile controalelor efectuate în paralel să se încadreze în intervalele acceptabile pentru metodă. Pentru metodologia și aparatele descrise mai sus, intervalele propuse pentru conținutul acceptabil de colorant pentru substanțele martor sunt prezentate în următorul tabel:

Substanță	martor	Intervalul conținutului de colorant (μg/disc)
Pozitivă	Acid clorhidric 10 M	40 - 100
Negativă	Apă distilată	15 - 35

Interpretarea rezultatelor

31. Valoarea-limită a RET care face distincția între substanțele chimice de testat corozive și cele necorozive a fost stabilită în timpul optimizării metodei de testare, testată într-o fază de pre-validare și confirmată în cadrul unui studiu de validare formală.

32. Modelul predictiv pentru metoda de testare a coroziunii pielii prin RET pe piele de șobolan (9) (19), asociat cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, este prezentat mai jos:

Substanța chimică de testat este considerată necorozivă pentru piele:

i) dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mare de 5 kΩ sau

ii) valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ și

— discurile de piele nu prezintă deteriorări evidente (de exemplu, perforare); și

— conținutul mediu de colorant pe disc este sub (<) conținutul mediu de colorant pe disc din martorul pozitiv HCl 10 M obținut în paralel (a se vedea punctul 30 pentru valori ale martorului pozitiv).

Substanța chimică de testat este considerată corozivă pentru piele:

i) Dacă valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ, iar discurile de piele sunt în mod evident deteriorate (de exemplu, perforate) sau

ii) valoarea medie a RET obținută pentru substanța chimică de testat este mai mică decât sau egală cu (≤) 5 kΩ și

— discurile de piele nu prezintă deteriorări evidente (de exemplu, perforare), însă

▼M8

— conținutul mediu de colorant pe disc este peste sau egal cu (≥) conținutul mediu de colorant pe disc din martorul pozitiv HCl 10 M obținut în paralel (a se vedea punctul 30 pentru valori ale martorului pozitiv).

33. Un singur test (experiment) compus din cel puțin trei discuri de piele duplicate ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. Însă, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor și/sau un procent mediu al RET egal cu 5 ± 5 kΩ, ar trebui avut în vedere un al doilea test (experiment) independent, precum și un al treilea în cazul unor rezultate discordante între primele două teste (experimente).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

34. Valorile rezistenței (kΩ) și valorile conținutului de colorant (μg/disc), după caz, pentru substanța chimică de testat, precum și pentru martorii pozitivi și negativi, ar trebui să fie consemnate în format tabelar, incluzând date pentru fiecare disc duplicat în cadrul fiecărui test (experiment) și valorile medii ± SD. Ar trebui să fie consemnate toate experimentele repetate. Deteriorările observate pe discurile de piele ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică de testat.

Raportul testului

35. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Animale de testare:

— sușa și sexul utilizat;

— vârsta animalelor atunci când sunt folosite ca animale donatoare;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— detalii privind pregătirea pielii.

▼M8

Condiții de testare:

— curbe de etalonare pentru aparatele de testare;

— curbe de etalonare pentru încercarea de legare a colorantului, filtrul de tip band pass pentru măsurarea valorilor densității optice și intervalul de liniaritate a DO a dispozitivului de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), dacă este cazul;

— detalii ale procedurii de testare utilizate pentru măsurările RET;

— detalii ale procedurii de testare utilizate pentru evaluarea legării colorantului, după caz;

— dozele de testare utilizate, durata perioadei (perioadelor) de expunere și temperatura (temperaturile) expunerii;

— detalii privind procedura de spălare utilizată după perioada de expunere;

— numărul de discuri de piele duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (martor pozitiv și negativ);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— trimiteri la datele istorice ale modelului. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) Acceptabilitatea valorilor RET ale substanțelor martor pozitive și negative (în kΩ) în raport cu intervalele de valori ale substanțelor martor pozitive și negative

ii) Acceptabilitatea valorilor privind conținutul de colorant al substanțelor martor pozitive și negative (în µg/disc) în raport cu intervalele de valori privind conținutul de colorant al substanțelor martor pozitive și negative

iii) Acceptabilitatea rezultatelor testelor în raport cu variabilitatea istorică dintre discurile de piele duplicate

— Descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat.

Rezultate:

— Prezentarea tabelară a datelor obținute în cadrul testelor RET și de legare a colorantului (dacă este cazul), în cazul fiecărei substanțe chimice de testat și fiecărui martor, pentru fiecare test (experiment) și pentru fiecare disc de piele duplicat (animale individuale și eșantioane de piele individuale), medii, SD și CV;

— descrierea tuturor efectelor observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS), a doua ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Model de piele *in vitro*.

(4) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

(5) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită.

(6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P. și Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P. și Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G. și Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. și Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. Publicația NIH nr. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC10), 3 aprilie 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publicația NIH nr. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr. 218. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A. şi Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J. şi Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

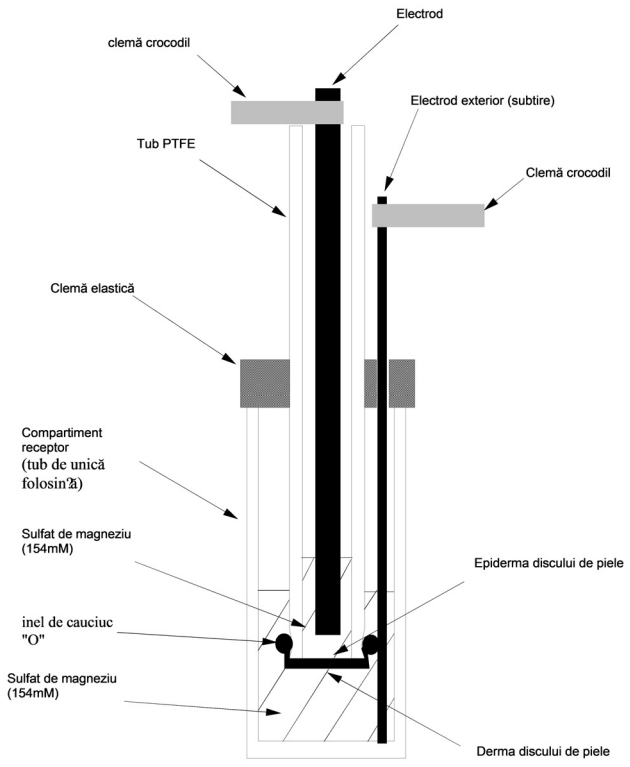
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. şi Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (decembrie 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

Figura 1

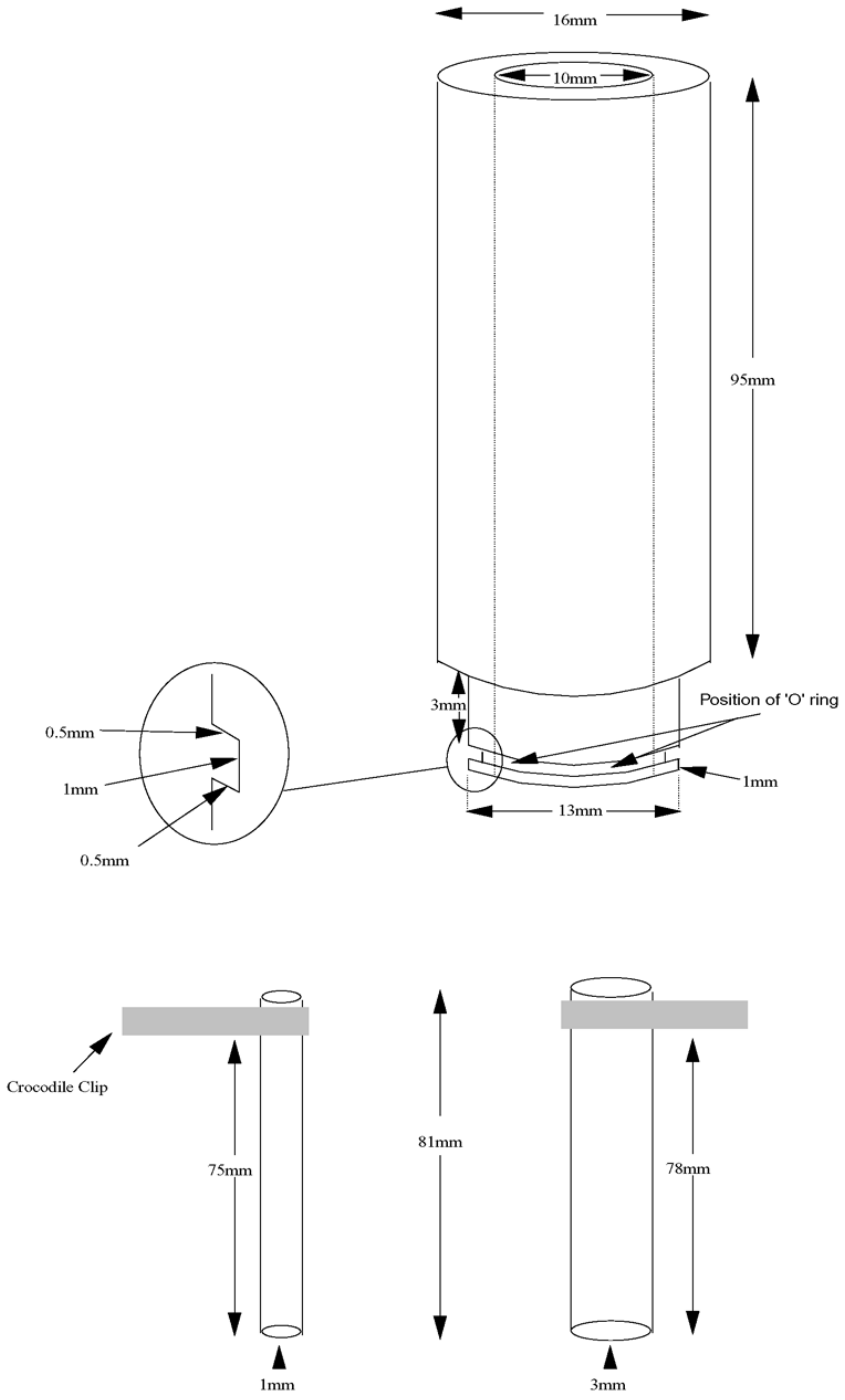
Aparatura Pentru Testarea Ret Pe Pielea De Șobolan



▼**M8**

Figura 2

Dimensiunile Tubului De Politetrafluoretilenă (Ptfe) Și A Tuburilor Receptoare Și A Electrozilor Utilizați



Factori importanți ai aparatului prezentat mai sus:

— diametrul interior al tubului PTFE,

— lungimea electrozilor în raport cu tubul PFTE și tubul receptor, astfel încât discul de piele să nu fie atins de electrozi, iar lungimea standard a electrodului să fie în contact cu soluția de $MgSO_4$,

▼**M8**

— cantitatea de soluție de $MgSO_4$ din tubul receptor ar trebui să fie suficientă pentru ca adâncimea lichidului, în raport cu nivelul din tubul PTFE, să fie astfel cum se arată în figura 1,

— discul de piele ar trebui fixat de tubul PFTE suficient de bine, astfel încât rezistența electrică să fie o măsură reală a proprietăților pielii.

▼M8

Apendice

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (20).

C: Coroziv.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Concordanță: Un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe” și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (20).

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

Amestec: Un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

DO: Densitate optică.

MP: Martor pozitiv, un duplicat conținând toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

▼**M8**

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință.

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (20).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (20).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (20).

Coroziunea cutanată *in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (20).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Testare: O singură substanță chimică de testat testată concomitent pe minim trei discuri de piele duplicate.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Rezistența electrică transcutanată (RET): O măsură a impedanței electrice a pielii, exprimată ca valoare a rezistenței în kiloohmi. Este o metodă simplă și fiabilă de evaluare a funcției de barieră a pielii prin înregistrarea trecerii ionilor prin piele folosind o punte Wheatstone.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼M8

B.40 bis. **COROZIUNE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ (RhE)**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 431 (2016). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în *epidermă*, ajungând în *dermă*, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare B.40bis actualizată asigură o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP. Aceasta permite, de asemenea, o subclasificare parțială a substanțelor corozive.

2. Evaluarea potențialului de coroziune cutanată al substanțelor chimice a implicat, de regulă, utilizarea de animale de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea TG nr. 404 a OCDE; adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (2). În plus față de actuala metodă de testare B.40bis, au fost validate și adoptate alte metode de testare *in vitro* pentru testarea potențialului de coroziune cutanată ale substanțelor chimice ca MT B.40 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și MT B.65 (echivalentă cu Orientarea TG nr. 435 a OCDE) (4). În plus, s-a adoptat metoda MT B.46 *in vitro* (echivalentă cu Orientarea TG nr. 439 a OCDE) pentru testarea potențialului de iritație cutanată. Un document de orientare privind strategiile integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (6).

3. Prezenta metodă de testare abordează coroziunea cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta utilizează epiderma umană reconstruită (RhE) (obținută din keratinocite epidermice netransformate derivate de la om), care imită aproape perfect proprietățile histologice, morfologice, biochimice și fiziologice ale părților superioare ale pielii umane, și anume, *epiderma*. Orientarea OCDE corespunzătoare privind testarea a fost inițial adoptată în 2004, actualizată în 2013 pentru a include metode de testare suplimentare bazate pe modele RhE și posibilitatea de a utiliza metodele pentru a susține subclasificarea substanțelor chimice corozive și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a introduce utilizarea unei proceduri alternative pentru măsurarea viabilității.

4. În această metodă de testare sunt incluse patru modele RhE validate disponibile în comerț. Studii de pre-validare (7), urmate de un studiu de validare oficial pentru evaluarea coroziunii pielii (8) (9) (10), au fost realizate (11) (12) pentru două dintre aceste modele de testare disponibile în comerț, EpiSkin ™ Standard Model (SM) și EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (denumite în textul de mai jos metode de referință validate - MRV). Rezultatul acestor studii a condus la recomandarea ca cele două MRV-uri menționate mai sus să poată fi utilizate în scopuri de reglementare pentru a distinge substanțele corozive (C) de substanțele

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

necorozive (NC) și ca EpiSkin™ să poată fi utilizată, în plus, pentru a susține subclasificarea substanțelor corozive (13) (14) (15). Alte două modele de testare RhE a coroziunii pielii *in vitro*, care sunt disponibile în comerț, au generat rezultate similare cu cele ale MRV EpiDerm™ conform validării bazate pe standardele de performanță (16) (17) (18). Acestea sunt SkinEthic™ RHE ([1]) și epiCS® (denumită anterior EST-1000) care pot fi, de asemenea, utilizate în scopuri de reglementare pentru a distinge substanțele corozive de cele necorozive (19) (20). Studiile post-validare realizate de producătorii modelului RhE în anii 2012-2014, cu un protocol îmbunătățit de corectare a interferențelor reducerii MTT nespecifice produse de substanțele chimice de testat, au îmbunătățit performanța atât a diferențierii C/NC, cât și a susținerii subclasificării substanțelor corozive (21) (22). Au fost efectuate alte analize statistice ale datelor post-validare generate cu EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și EpiCS® pentru identificarea modelelor alternative de predicție care au îmbunătățit capacitatea predictivă pentru subclasificare (23).

5. Înainte să se poată utiliza în scopuri de reglementare o metodă de testare RhE *in vitro* similară sau modificată propusă pentru coroziunea cutanată, alta decât MRV-urile, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acesteia pentru scopul propus al acesteia pentru a asigura similaritatea acesteia cu MRV-urile în conformitate cu cerințele standardelor de performanță (PS) (24) prevăzute în concordanță cu principiile din documentul de orientare nr. 34 al OCDE (25). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea aferentă privind testarea a oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță. Modelele de testare incluse în respectiva orientarea privind testarea pot fi utilizate pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor privind metoda de testare *in vitro* pentru coroziunea cutanată, în același timp beneficiind de acceptarea reciprocă a datelor.

DEFINIȚII

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

7. Această metodă de testare permite identificarea substanțelor și amestecurilor necorozive și corozive în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP. Această metodă de testare susține, în continuare, subclasificarea substanțelor și amestecurilor corozive în subcategoria opțională 1A, în conformitate cu GHS al ONU (1), precum și o combinație între subcategoriile 1B și 1C (21) (22) (23). O limitare a acestei metode de testare o constituie faptul că nu permite diferențierea între subcategoria de substanțe corozive pentru piele 1B și subcategoria 1C în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP din cauza setului limitat de substanțe chimice corozive *in vivo* bine cunoscute din subcategoria 1C. Modelele de testare EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și epiCS® pot stabili subcategorii (și anume, 1A față de 1B și 1C față de NC)

8. Se testează o gamă largă de substanțe chimice reprezentând, în principal, substanțe individuale în cadrul validării care susține modelele de testare incluse în prezenta metodă de testare, atunci când acestea sunt utilizate pentru identificarea substanțelor necorozive și a celor corozive; baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă 60 de substanțe chimice dintr-o gamă largă de clase de substanțe chimice (8) (9) (10). Testul

([1]) Abrevierea „RhE” (= epidermă umană reconstruită) este utilizată pentru toate modelele bazate pe tehnologia RhE. Acronimul RHE, astfel cum este utilizat în combinație cu modelul SkinEthic™, înseamnă același lucru dar, ca parte a denumirii comerciale a acestei metode de testare specifice, este scris integral cu majuscule.

▼M8

pentru demonstrarea sensibilității, a specificității, a preciziei și a reproductibilității în laborator a testului pentru subclasificare a fost realizat de către dezvoltatorii metodei de testare și rezultatele au fost analizate de OCDE (21) (22) (23). Pe baza datelor generale disponibile, metoda de testare este aplicabilă pentru o gamă largă de clase de substanțe chimice și stări fizice, inclusiv lichide, semisolide, solide și ceruri. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a modelelor de testare incluse în această metodă de testare la o anumită categorie de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui să fie utilizate pentru respectiva categorie de substanțe chimice de testat. În plus, se presupune că această metodă de testare este aplicabilă pentru amestecuri ca o extindere a aplicabilității sale la substanțe. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri [de exemplu, în urma unei strategii propuse la punctul (26)], metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul studiilor de validare (8) (9) (10). Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

9. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT, și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate tisulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții. Tipul de martori adaptați care pot fi necesari vor varia în funcție de tipul de interferență produsă de substanța chimică de testat și de procedura utilizată pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctele 25-31).

10. Chiar dacă această metodă de testare nu furnizează informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 abordează în mod specific iritația cutanată *in vitro* ca efect asupra sănătății și se bazează pe același sistem de testare RhE, deși cu utilizarea unui alt protocol (5). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (6). Această abordare IATA include efectuarea de teste *in vitro* pentru coroziunea cutanată (așa cum sunt descrise în prezenta metodă de testare) și pentru iritarea cutanată, înainte de a se lua în considerare testarea pe animale vii. Este recunoscut faptul că utilizarea de piele umană face obiectul considerațiilor etice și al condițiilor stabilite la nivel național și internațional.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Substanța chimică de testat se aplică local pe un model tridimensional de RhE compus din keratinocite ne-transformate derivate din epidermă umană care au fost cultivate pentru a forma un model multistratificat extrem de diferențiat de epidermă umană. Modelul este compus din straturi organizate (bazal, spinos și granular), precum și dintr-un strat cornos multistratificat care conține straturi lipidice lamelare intercelulare reprezentând principalele clase lipidice similare celor observate *in vivo*.

▼M8

12. Metoda de testare RhE se bazează pe ipoteza că substanțele chimice corozive pot să penetreze stratul cornos prin difuziune sau eroziune și sunt citotoxice pentru celulele din straturile inferioare. Viabilitatea celulară se măsoară prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1] într-o sare de formazan de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (27). Substanțele chimice corozive sunt identificate pe baza capacității acestora de a reduce viabilitatea celulară sub pragurile stabilite (a se vedea punctele 35 și 36). Metoda de testare RhE pentru coroziunea cutanată s-a dovedit a prezice efectele de coroziune cutanată *in vivo* evaluate la iepuri conform MT B.4 (2).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

13. Înainte de utilizarea sistematică a oricăruia dintre modelele de testare validate RhE care respectă prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice proprii prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare enumerate în tabelul 1. În cazul utilizării unei metode de subclasificare, ar trebui demonstrată, de asemenea, subclasificarea corectă. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (24)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare (1)

martor	NR CAS	Clasa chimică (2)	Categ. conf. GHS al ONU/CLP pe baza rezultatelor *in vivo* (3)	MRV Categ. bazată pe rezultate *in vitro* (4)	MTT Reductor (5)	Stare fizică
Subcategoria 1A de substanțe corozive *in vivo*						
Acid bromacetic	79-08-3	Acid organic	1A	(3) 1A	—	S
Trifluorură de bor, dihidrat	13319-75-0	Acid anorganic	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Clorură de dicloracetil	79-36-7	Electrofil	1A	(3) 1A	—	L
Combinație între subcategoriile de substanțe corozive 1B și 1C *in vivo*						
Monohidrat de acid glioxilic	563-96-2	Acid organic	1B-și-1C	(3) 1B-și-1C	—	S
Acid lactic	598-82-3	Acid organic	1B-și-1C	(3) 1B-și-1C	—	L
Etanolamină	141-43-5	Bază organică	1B	(3) 1B-și-1C	Y	Vâscoasă

▼**M8**

martor	NR CAS	Clasa chimică ([2])	Categ. conf. GHS al ONU/CLP pe baza rezultatelor *in vivo* ([3])	MRV Categ. bazată pe rezultate *in vitro* ([4])	MTT Reductor ([5])	Stare fizică
Subcategoria 1A de substanțe corozive *in vivo*						
Acid hidrocloric (14,4 %)	7647-01-0	Acid anorganic	1B-şi-1C	(3) 1B-şi-1C	—	L
Substanțe necorozive *in vivo*						
Bromură de fenetil	103-63-9	Electrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Bază organică	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltio)-benzaldehidă	3446-89-7	Electrofil	NC	(3) NC	Y	L
Acid lauric	143-07-7	Acid organic	NC	(3) NC	—	S

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; MRV = Metodă de referință validată; NC = necoroziv; Y = da; S = solid; L = lichid

([1]) Substanțele de verificare, sortate mai întâi pe substanțe corozive/necorozive, apoi în subcategorii de substanțe corozive şi apoi pe clase chimice, au fost selectate din substanțele utilizate în studiile de validare ECVAM pentru EpiSkin™ şi EpiDerm™ (8) (9) (10) şi din studiile de post-validare pe baza datelor furnizate de dezvoltatorii EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ şi epiCS® (23). Cu excepția cazului în care se indică altfel, substanțele au fost testate la nivelul de puritate obținut atunci când au fost achiziționate dintr-o sursă comercială (8) (10). Selecția include, în măsura posibilității, substanțe care: (i) sunt reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțe slab corozive şi puternic corozive) pe care MRV-urile pot să le măsoare sau să le estimeze; (ii) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiile de validare; (iii) au structuri chimice bine definite; (iv) induc rezultate reproductibile în MRV; (v) induc rezultate definitive în metoda de testare de referință *in vivo*; (vi) sunt disponibile în comerț; şi (vii) nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive.

([2]) Clasa de substanțe chimice stabilită de Barratt *et al.* (8).

([3]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II şi, respectiv, III pentru 1A, 1B şi 1C din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

([4]) Predicțiile MRV *in vitro* raportate în acest tabel au fost obținute utilizând modelele de testare EpiSkin™ şi EpiDerm™ (MRV-uri) în timpul testului de post-validare realizat de către dezvoltatorii metodelor de testare.

([5]) Valorile de viabilitate obținute în cadrul studiilor de validare ECVAM pentru coroziunea cutanată nu au fost corectate pentru reducerea directă a MTT (martorii eutanasiați nu au fost analizați în cadrul studiilor de validare). Însă, datele post-validare generate de dezvoltatorii metodelor de testare, care sunt prezentate în acest tabel, au fost dobândite cu martori adaptați (23).

14. Ca parte a demonstrării performanței, se recomandă ca utilizatorul să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire astfel cum sunt specificate de producătorul modelului de RhE. Această etapă este în mod special importantă în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade de timp lungi. Odată ce o metodă de testare a fost stabilită cu succes, iar performanța acesteia în utilizare a fost demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic o metodă de testare, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

PROCEDURA

15. În continuare este prezentată o descriere generică a componentelor şi a procedurilor modelelor de testare RhE pentru evaluarea coroziunii cutanate care fac obiectul prezentei metode de testare. Modelele RhE confirmate ca fiind valabile din punct de vedere ştiințific pentru a fi utilizate în cadrul acestei metode de testare, şi anume, modelele EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE and epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), pot fi obținute din surse comerciale. Există proceduri standard de operare (PSO) pentru aceste patru modele RhE (34) (35) (36) (37), iar componentele principale ale acestora pentru metoda de testare sunt prezentate pe scurt în apendicele 2. Se recomandă să se consulte PSO relevantă la implementarea şi utilizarea unuia dintre aceste modele în laborator. Testarea

▼M8

cu cele patru modele de testare RhE care fac obiectul prezentei metode de testare ar trebui să respecte următoarele condiții:

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE RHE

Condiții generale

16. Pentru reconstrucția epiteliului ar trebui utilizate keratinocite umane ne-transformate. Sub stratul cornos funcțional ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile (stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos). Stratul cornos ar trebui să fie multistratificat și să prezinte profilul lipidic esențial pentru a constitui o barieră funcțională robustă care să reziste la penetrarea rapidă a substanțelor citotoxice de referință, de exemplu dodecilsulfatul de sodiu (SDS) sau Triton X-100. Bariera funcțională ar trebui demonstrată și poate fi evaluată fie prin stabilirea concentrației la care substanța chimică de referință reduce viabilitatea țesuturilor cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere, fie prin stabilirea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă (a se vedea punctul 18). Etanșeitatea modelului RhE ar trebui să prevină trecerea substanței dincolo de stratul cornos către țesutul viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelizare a expunerii pielii. Modelul RhE nu trebuie să fie contaminat cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Condiții funcționale

Viabilitate

17. Testul utilizat pentru cuantificarea viabilității tisulare este testul MTT (27). Celulele viabile ale structurii țesutului RhE reduc colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). DO a solventului de extracție trebuie să fie suficient de mică, și anume DO < 0,1. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței (DO), fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (38). Utilizatorii modelului RhE ar trebui să se asigure că fiecare lot de model RhE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Producătorul/furnizorul modelului RhE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ. Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru cele patru modele de testare RhE validate incluse în prezenta metodă de testare sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat faptul că țesuturile tratate cu substanță martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători DO similare) în perioada de expunere.

Tabelul 2

Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru controlul calității lotului

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Funcția de barieră

18. Stratul cornos și compoziția lipidică a acestuia ar trebui să fie suficiente pentru a rezista la penetrarea rapidă a anumitor substanțe chimice citotoxice de referință (de exemplu, SDS sau Triton X-100), astfel cum este estimat prin IC_{50} sau ET_{50} (tabelul 3). Funcția de barieră a fiecărui lot de model RhE utilizat ar trebui să fie demonstrată de către producătorul/furnizorul modelului RhE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 21).

Morfologie

19. Ar trebui să fie efectuată examinarea histologică a modelului RhE, cu demonstrarea structurii de epidermă umană multi-stratificată care conține stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos și stratul cornos și prezintă un profil lipidic similar cu profilul lipidic al epidermei umane. Examinarea histologică a fiecărui lot de model RhE utilizat, care demonstrează o morfologie adecvată a țesuturilor, ar trebui să fie asigurată de către producătorul/furnizorul modelului RhE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 21).

Reproductibilitate

20. Utilizatorii metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea metodelor de testare în timp cu martori pozitivi și negativi. În plus, metoda de testare ar trebui să fie utilizată numai în cazul în care producătorul/furnizorul modelului RhE furnizează date care demonstrează reproductibilitatea în timp cu substanțe chimice corozive și necorozive, de exemplu, din lista substanțelor de verificare (tabelul 1). În cazul utilizării unei metode de testare pentru subclasificare, ar trebui demonstrată, de asemenea, reproductibilitatea în raport cu subclasificarea.

Controlul calității (CC)

21. Modelul RhE ar trebui să fie utilizat doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de modele RhE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai importante sunt criteriile privind *viabilitatea* (punctul 17), *funcția de barieră* (punctul 18) și *morfologia* (punctul 19). Datele respective sunt furnizate utilizatorilor metodei de testare pentru ca aceștia să le poată include în raportul de testare. Numai rezultatele obținute pe baza unor loturi de țesuturi acceptate în urma CC pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a clasificării privind coroziunea. Producătorul/furnizorul modelului RhE stabilește un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru IC50 sau ET50. Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele de teste validate sunt date în tabelul 3.

Tabelul 3

Criterii pentru controlul calității lotului

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM) (18 ore de tratament cu SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 ore	ET50 = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 ore	ET50 = 10,0 ore
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 ore	ET50 = 7,0 ore

▼M8

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

22. Pentru fiecare substanță chimică de testat și martori pentru fiecare expunere ar trebui să se utilizeze cel puțin două țesuturi duplicate. Atât în cazul substanțelor chimice lichide, cât și în cazul celor solide, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat pentru a acoperi uniform suprafața epidermei, evitându-se totodată o doză infinită, și anume, ar trebui utilizată o cantitate minimă de 70 µl/cm^2 sau 30 mg/cm^2. În funcție de modele, suprafața epidermei ar trebui umezită cu apă deionizată sau distilată înainte de aplicarea substanțelor chimice solide, pentru a îmbunătăți contactul dintre substanța chimică de testare și suprafața epidermei (34) (35) (36) (37). În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Metoda de aplicare ar trebui să fie adecvată pentru substanța chimică de testat [a se vedea, de exemplu, referințele (34-37)]. La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat ar trebui spălată cu atenție de pe suprafața epidermei, utilizând o soluție-tampon apoasă sau NaCl de 0,9 %. În funcție de care dintre cele patru modele de testare RhE validate este utilizat, se folosesc două sau trei perioade de expunere pentru fiecare substanță chimică de testat (pentru toate cele patru modele RhE valabile: 3 min. și o oră; pentru EpiSkin™, un timp de expunere suplimentar de patru ore). În funcție de modelul de testare RhE utilizat și de perioada de expunere estimată, temperatura de incubare în timpul expunerii poate varia între temperatura camerei și 37 °C.

23. Pentru fiecare test ar trebui utilizați simultan martori negativi și pozitivi (MP) pentru a demonstra că viabilitatea (cu martori negativi), funcția de barieră și sensibilitatea rezultată a țesuturilor (cu MP) se încadrează în intervalul de valori istorice acceptabile stabilit. Substanțele chimice CP sugerate sunt acidul acetic glacial sau 8N KOH, în funcție de modelul RhE utilizat. Ar trebui remarcat faptul că 8N KOH este un reductor MTT direct care ar putea necesita martori adaptați, astfel cum este descris la punctele 25 și 26. Martorii negativi recomandați sunt 0,9 % (g/v) NaCl sau apă.

Măsurători ale viabilității celulare

24. Testul MTT, care este un test cantitativ, ar trebui să fie utilizat pentru măsurarea viabilității celulare în cadrul prezentei metode de testare (27). Mostra de țesut este introdusă într-o soluție de MTT având o concentrație adecvată (0,3 sau 1 mg/ml) timp de trei ore. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras din țesut utilizând un solvent (de exemplu izopropanol, izopropanol acid) și concentrația de formazan se măsoară determinând DO la 570 nm folosind o bandă de filtrare de maximum ±30 nm, sau printr-o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctele 30 și 31) (38).

25. Substanțele chimice de testat pot interfera cu testul MTT prin reducerea directă a MTT în formazan de culoare albastră și/sau prin interferența culorii în cazul în care substanța chimică de testat absoarbe, în mod natural sau datorită procedurilor de tratament, în aceeași gamă DO pentru formazan (570 ± 30 nm, în principal, substanțe chimice de culoare albastră și violetă). Ar trebui utilizați martori suplimentari pentru a detecta și a corecta o eventuală interferență a acestor substanțe chimice de testat, cum ar fi martorul nespecific pentru reducerea MTT (NSMTT) și martorul nespecific de culoare (NSC) (a se vedea punctele 26-30). Acest lucru este deosebit de important atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este îndepărtată complet din țesut prin spălare sau atunci când aceasta pătrunde în epidermă și, prin urmare, există în țesuturi atunci când se efectuează testul de viabilitate MTT. O descriere detaliată a modului în care poate fi corectată direct reducerea MTT și interferențele cu ajutorul agenților de colorare este disponibilă în PSO pentru modelele de testare (34) (35) (36) (37).

▼M8

26. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la un mediu de MTT proaspăt preparat (34) (35) (36) (37). Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a epidermei neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb substanța chimică de testat în cantități similare ca țesuturi viabile. Fiecare substanță chimică de reducere a MTT este aplicată pe cel puțin două duplicate de țesuturi moarte la un interval de expunere, acestea fiind supuse întregului test de coroziune cutanată. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT).

27. Pentru a identifica o posibilă interferență cauzată de substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care s-au colorat în contact cu apa sau cu izopropanolul și a decide dacă sunt necesare verificări suplimentare, ar trebui să se efectueze analiza spectrală a substanței chimice de testat în apă (mediu în timpul expunerii) și/sau izopropanol (soluție de extracție). În cazul în care substanța chimică de testat în apă și/sau izopropanol absoarbe lumina în intervalul de 570 ± 30 nm, ar trebui efectuate verificări suplimentare pe colorant sau, în mod alternativ, ar trebui să se utilizeze o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, iar în acest caz aceste verificări nu sunt necesare (a se vedea punctele 30 și 31). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat care interferează este aplicată pe cel puțin două duplicate de țesut viabile la un interval de expunere, acestea fiind supuse întregului test de coroziune cutanată, dar sunt incubate în mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}). Testul pe martorul NSC_{living} trebuie să fie efectuat concomitent în intervalul de expunere pentru fiecare substanță chimică de testat colorată (în cadrul fiecărui test), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT, minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}).

28. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât o reducere directă a MTT (a se vedea punctul 26), cât și interferența culorii (a se vedea punctul 27) va necesita, de asemenea, un al treilea set de martori, în afară de NSMTT și martorii NSC_{living} descriși la punctele anterioare, la efectuarea măsurătorii standard a absorbanței (DO). Acest lucru se întâmplă, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat colorate în nuanțe închise care interferează cu testul MTT (de exemplu, albastru, violet, negru), deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce în mod direct MTT, astfel cum este descris la punctul 26. Aceste substanțe chimice de testat se pot prinde atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte și, prin urmare, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării substanței chimice de testat la țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC_{living} corectează deja interferența culorii determinată de prinderea substanței chimice de testat de țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuată o a treia verificare pentru culoarea nespecifică la țesuturile moarte (NSCkilled). În cadrul acestei verificări suplimentare, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate în fiecare interval de expunere, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate în mediu în locul soluției de MTT în etapa de incubare a

▼M8

MTT. O singură verificare pentru martorul NSC_{killed} este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și, dacă este posibil, pe același lot de țesuturi. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat % NSMTT minus $\%NSC_{living}$plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{killed}).

29. Este important de precizat că reducerea valorii MTT nespecifice și interferențele culorii nespecifice pot crește valorile de citire ale extractului de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, fiecare laborator ar trebui să stabilească intervalul de liniaritate al spectrofotometrului lor pentru formazan MTT (CAS # 57360-69-7) dintr-o sursă comercială înainte de a iniția testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare. În mod specific, măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor direcți ai MTT și a substanțelor chimice care interferează cu culorile atunci când valorile DO ale extractelor de țesuturi, care sunt obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferența culorii, se află în intervalul liniar al spectrofotometrului sau atunci când procentul de viabilitate necorectat obținut cu substanța chimică de testat a fost deja definit ca fiind coroziv (a se vedea punctele 35 și 36). Totuși, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % NSC_{living} > 50 % din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție.

30. Pentru substanțele chimice de testat colorate care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) din cauza unei interferențe prea puternice cu testul MTT, poate fi utilizată procedura de spectrofotometrie HPLC/UPLC alternativă pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctul 31) (37). Sistemul de spectrofotometrie HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică de testat înainte de cuantificarea sa (38). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Martorii NSMTT ar trebui să fie totuși utilizați în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce în mod direct MTT sau are o culoare care împiedică evaluarea capacității de a reduce MTT în mod direct (conform descrierii de la punctul 26). Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Pentru substanțele chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează ca procent de viabilitate tisulară obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat, minus % NSMTT. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT, care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

▼M8

31. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, de asemenea, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (38). Datorită diversității sistemelor de spectrofotometrie HPLC/UPLC, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (38) (39). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 4. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 4 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptabilitate

32. Pentru fiecare metodă de testare care aplică modele RhE valabile, țesuturile tratate cu martor negativ ar trebui să prezinte o valoare DO care să reflecte calitatea țesuturilor, așa cum este descris în tabelul 2, și nu ar trebui să fie sub limitele istorice stabilite. Țesuturile tratate cu MP, și anume, acidul acetic glacial sau 8N KOH, ar trebui să reflecte capacitatea țesuturilor de a reacționa la o substanță chimică corozivă în condițiile modelului de testare (a se vedea apendicele 2). Variabilitatea dintre țesuturile duplicate ale substanței chimice de testat și/sau ale substanțelor chimice martor ar trebui să se încadreze în limitele acceptate pentru fiecare cerință valabilă a modelului RhE (a se vedea apendicele 2) (de exemplu, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %). În cazul în care martorul negativ sau MP inclus într-un test nu se încadrează în intervalele acceptate, se consideră că testul nu este calificat și ar trebui să fie repetat. În cazul în care variabilitatea substanțelor chimice de testat se încadrează în afara intervalului definit, testul ar trebui să fie repetat.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

33. Valorile DO obținute pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui utilizate pentru a calcula un procent de viabilitate relativ la martorul negativ, care este stabilit la 100 %. În cazul în care se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Valorile procentuale-limită ale viabilității celulare care fac distincția între substanțele chimice de testat corozive și cele necorozive (sau care diferențiază diferite subcategorii de substanțe corozive) sunt definite mai jos, la punctele 35 și 36 pentru fiecare dintre modelele de testare vizate de prezenta metodă de testare și ar trebui să fie utilizate la interpretarea rezultatelor.

34. Un singur test compus din cel puțin două duplicate de țesuturi ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea aferentă este fără echivoc. Însă, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor, ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

35. Modelul predictiv pentru modelul de testare a coroziunii cutanate EpiSkin™ (9) (34) (22), asociat cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, este prezentat în tabelul 4:

▼M8

Tabelul 4

Modelul predictiv EpiSkin™

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3, 60 și 240 de minute)	Predicția avută în vedere
< 35 % după o expunere de trei minute	**Coroziv:** • Subcategoria 1A opțională (*)
≥ 35 % după o expunere de trei minute **ȘI** < 35 % după o expunere de 60 de minute **SAU** ≥ 35 % după o expunere de 60 de minute **ȘI** < 35 % după o expunere de 240 de minute	**Coroziv:** • O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
≥ 35 % după o expunere de 240 de minute	**Necoroziv**

(*) Conform datelor generate în vederea evaluării utilității modelelor de testare RhE pentru susținerea clasificării în subcategorii, s-a arătat că aproximativ 22 % din rezultatele din subcategoria 1A ale modelului de testare EpiSkin™ pot fi, de fapt, considerate substanțe/amestecuri din subcategoria 1B sau 1C (și anume, supraclasificări) (a se vedea apendicele 3).

36. Modelele predictive pentru EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), modelele de testare a coroziunii cutanate SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) și epiCS® (16) (23) (37), care sunt asociate cu sistemul de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP, sunt indicate în tabelul 5:

Tabelul 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE și epiCS®

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3 și 60 de minute)	Predicția avută în vedere
ETAPA 1 pentru EpiDerm™ SCT, pentru SkinEthic™ RHE și epiCS®	
< 50 % după o expunere de trei minute	Coroziv
≥ 50 % după o expunere de trei minute **ȘI** < 15 % după o expunere de 60 de minute	Coroziv
≥ 50 % după o expunere de trei minute **ȘI** ≥ 15 % după o expunere de 60 de minute	Necoroziv
Etapa 2 pentru EpiDerm™ SCT - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 25 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *
≥ 25 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
Etapa 2 pentru SkinEthic™ RHE - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 18 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *

▼M8

Viabilitatea măsurată după puncte ale intervalului de expunere (t = 3 și 60 de minute)	Predicția avută în vedere
ETAPA 1 pentru EpiDerm™ SCT, pentru SkinEthic™ RHE și epiCS®	
≥ 18 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale
Etapa 2 pentru epiCS® - pentru substanțe/amestecuri identificate ca fiind corozive în etapa 1	
< 15 % după o expunere de trei minute	Subcategoria 1A opțională *
≥ 15 % după o expunere de trei minute	O combinație a subcategoriilor 1B și 1C opționale

DATE ȘI RAPORTARE

Date

37. Pentru fiecare test, ar trebui consemnate în format tabelar datele obținute pentru fiecare țesut duplicat (de exemplu, valorile DO și datele procentuale privind viabilitatea celulară calculate pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea), inclusiv datele obținute în urma repetării experimentelor, dacă este cazul. În plus, ar trebui să se consemneze valorile medii și intervalele de viabilitate, precum și valorile VC dintre țesuturile duplicate pentru fiecare test. Interacțiunile observate cu reactivul MTT prin reductorii direcți MTT sau substanțele chimice de testat colorate ar trebui consemnate pentru fiecare substanță chimică testată.

Raportul testului

38. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat și substanțele chimice martor:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Modelul și protocolul RhE utilizate, precum și justificarea acestora (dacă este cazul)

Condiții de testare:

— Modelul RhE utilizat (inclusiv numărul lotului);

▼**M8**

— Informațiile privind calibrarea pentru dispozitivul de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de linearitate al dispozitivului de măsurare;

— Descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— Descrierea calificării sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC, dacă este cazul;

— informații de asistență complete privind modelul de RhE utilizat, inclusiv performanța acestuia. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) viabilitatea;

ii) funcția de barieră;

iii) morfologia;

iv) reproductibilitatea și capacitatea de estimare;

v) controalele de calitate (CC) asupra modelului;

— Trimiteri la datele istorice ale modelului. Aceastea ar trebui să includă, printre altele acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul;

— demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor de verificare.

Procedura de testare:

— detalii privind procedura de testare utilizată (inclusiv procedurile de spălare utilizate după perioada de expunere);

— dozele de substanțe chimice de testat și de substanțe chimice martor utilizate;

— durata perioadei (perioadelor) de expunere și temperatura (temperaturile) expunerii;

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de țesuturi duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (MP, martor negativ și NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul), pe interval de expunere;

— descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat pe baza modelului RhE utilizat;

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare (inclusiv procedurile de spălare).

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

▼M8

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru substanța chimică de testat.

Rezultate:

— prezentarea tabelară a datelor pentru fiecare substanță chimică de testat și martor, pentru fiecare perioadă de expunere, fiecare test și fiecare măsurare duplicată care include valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară, diferențele între duplicate, valorile DS și/sau VC, dacă este cazul;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice de colorare, inclusiv valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, diferențe între țesuturile duplicate, valorile DS și/sau VC (dacă este cazul), precum și procentul final corect de viabilitate tisulară;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și substanțele chimice martor în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ONU (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS). A cincea ediție revizuită, ONU New York și Geneva. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*.

(4) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

(5) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită.

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P. și Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P. și Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G. și Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. și Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. și Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. Publicația NIH nr. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Publicația NIH nr. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, SUA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC10), 3 aprilie 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC14), 21 martie 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. și Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B. și Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals Conform noii Orientări TG 431 a OCDE. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. și Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC25), 17 noiembrie 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, emisă de căte Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC30), 12 iunie 2009.

▼**M8**

(21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 190). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H. și Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N. și Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. În: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M și Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. și Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J și Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. și Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS și Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF și Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (decembrie 2011). *INVITTOX* Protocol (nr. 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (februarie 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (ianuarie 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (ianuarie 2012). Versiunea 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M. şi McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (mai 2001). Publicație disponibilă la adresa: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (25).

Viabilitate celulară: Parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare, de exemplu, capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT [bromură de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil], care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Concordanță: Este un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe” și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (25).

ET_{50}: Poate fi estimat prin calcularea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % odată cu aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă (a se vedea, de asemenea, IC_{50}).

GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (1).

HPLC: Cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

IC_{50}: Poate fi estimat prin determinarea concentrației la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere (a se vedea, de asemenea, ET_{50}).

Doză infinită: Cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe epidermă, care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epidermei.

Amestec:: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

▼**M8**

MTT:: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație > 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

Martorul NSC_{killed}: Martor de culoare nespecifică la țesuturi moarte.

Martor NSC_{living}: Martor de culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

DO: Densitate optică

MP: Martor pozitiv, un duplicat care conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință (25).

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (25).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (25).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un MP.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (25).

▼**M8**

Coroziunea cutanată *in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (25).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼M8

Apendicele 2

COMPONENTELE PRINCIPALE ALE MODELELOR DE TESTARE RHE VALIDATE PENTRU TESTUL DE COROZIUNE CUTANATĂ

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Suprafața modelelor	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Numărul de țesuturi duplicate	Cel puțin 2 pe interval de expunere	2-3 pe interval de expunere	Cel puțin 2 pe interval de expunere	Cel puțin 2 pe interval de expunere
Doze de tratament și aplicare	Substanțe lichide și vâscoase: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Substanțe solide: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + soluție 100 µl ± 5µl NaCl (9 g/l) Substanțe ceroase/lipicioase: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) cu o plasă din nailon	Substanțe lichide: 50 µl (79,4 µl/cm^2) cu sau fără o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe semisolide: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Substanțe solide: 25 µl H_2O (sau mai mult, dacă este necesar) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Ceruri: o bucată circulară plată cu diametrul de aproximativ 8 mm, așezată pe țesutul înmuiat în 15 µl H_2O.	Substanțe lichide și vâscoase: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) folosind o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe solide: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Substanțe ceroase/lipicioase: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) folosind o plasă din nailon	Substanțe lichide: 50 µl (83,3 µl/cm^2) folosind o plasă din nailon *Verificarea compatibilității substanței chimice de testat cu plasa de nailon înainte de testare* Substanțe semisolide: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Substanțe solide: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (sau mai mult, dacă este necesar) Substanțe ceroase: o bucată plată în formă de fursec, având diametrul de aproximativ 8 mm, așezată pe țesutul înmuiat în 15 µl H_2O
Pre-verificare pentru reducția directă a MTT	50 µl (lichide) sau 20 mg (solide)+ 2 ml MTT soluție de 0,3 mg/ml pentru 180 ± 5 minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă	50 µl (lichide) sau 25 mg (solide) + 1 ml MTT soluție de 1 mg/ml pentru 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	40 µl (lichide) sau 20 mg (solide)+ 1 ml MTT 1 mg/ml soluție pentru 180± 15 min la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	50 µl (lichide) sau 25 mg (solide) + 1 ml MTT soluție de 1 mg/ml pentru 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare

▼M8

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pre-verificarea pentru interferența culorii	10 µl (lichid) sau 10 mg (solid) + 90 µl H_2O amestecat timp de 15 minute la temperatura camerei → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	50 µl (lichid) sau 25 mg (solid) + 300 µl H_2O timp de 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	40 µl (lichid) sau 20mg (solid) + 300 µl H_2O amestecat timp de 60 de minute la temperatura camerei → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	50 µl (lichid) sau 25 mg (solid) + 300 µl H_2O timp de 60 de minute la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → în cazul în care soluția se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați
Interval de expunere și temperatură	3 min., 60 min. (± 5 min.) și 240 min. (± 10 min.) În spațiu ventilat Temperatura camerei (TC, 18-28°C)	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min. la TC și 60 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Clătire	25 ml 1 x PBS (2 ml/eliminare)	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS	de 20 de ori sub jet slab și constant de 1 x PBS
Martor negativ	50 µl de soluție NaCl (9 g/l) Testat la fiecare interval de expunere	50 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere	40 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere	50 µl H_2O Testat la fiecare interval de expunere
Martor pozitiv	50 µl de acid acetic glacial Testat doar pentru 4 ore	50 µl 8N KOH Testat la fiecare interval de expunere	40 µl 8N KOH Testat doar pentru 1 oră	50 µl 8N KOH Testat la fiecare interval de expunere
Soluția MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Timpul și temperatura incubației MTT	180 min. (± 15 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. (± 15 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min. la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Componentele modelelor de testare	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Solvent de extracție	500 µl izopropanol acidifiat (0,04 N HCl în izopropanol) (țesut izolat scufundat complet)	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)
Timpul și temperatura de extracție	Peste noapte, la temperatura camerei (TC), ferit de lumină	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC	Peste noapte, fără agitare, la temperatura camerei sau timp de 120 min. cu agitare (~ 120 rpm) la TC
Citirea DO	570 nm (545 - 595 nm) fără filtru de referință	570 nm (sau 540 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință	540 - 570 nm fără filtru de referință
Controlul calității țesutului	18 ore de tratament cu SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Tratament cu 1 % Triton X-100 4,08 ore ≤ ET_{50} ≤ 8,7 ore	Tratament cu 1 % Triton X-100 4,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 10,0 ore	Tratament cu 1 % Triton X-100 2,0 ore ≤ ET_{50} ≤ 7,0 ore
Criterii de acceptabilitate	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (NaCl) ar trebui să fie ≥ 0,6 și ≤ 1,5 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de 4 ore cu martorul pozitiv (acid acetic glacial), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 20 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %.	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 2,8 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 15 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 %, coeficientul de variație (CV) între țesuturile duplicate ar trebui să fie de ≤ 30 %.	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 3,0 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră (și patru ore, dacă este cazul) cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 15 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %	1. DO medie a țesuturilor duplicate tratate cu martorul negativ (H_2O) ar trebui să fie ≥ 0,8 și ≤ 2,8 pentru fiecare interval de expunere 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de o oră cu martorul pozitiv (8N KOH), exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 20 % 3. În intervalul de viabilitate 20-100 % și pentru valori DO ≥ 0,3, diferența de viabilitate între cele două țesuturi duplicate nu ar trebui să depășească 30 %

▼**M8**

Apendicele 3

PERFORMANȚA MODELELOR DE TESTARE PENTRU SUBCLASIFICARE

Tabelul de mai jos prezintă performanțele celor patru modele de testare calculate pe baza unui set de 80 de substanțe chimice testate de către cei patru dezvoltatori de teste. Calculele au fost efectuate de către Secretariatul OCDE, revizuite și convenite de un subgrup de experți (21) (23).

Modelele de testare EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ și epiCS® pot stabili subcategorii (și anume, 1A față de 1B și 1C față de NC)

Performanțele, ratele de supraclasificare, ratele de subclasificare și precizia (capacitatea predictivă) a celor patru modele de testare bazate pe un set de 80 de substanțe chimice testate toate în cadrul a două sau trei teste pentru fiecare model de testare:

STATISTICI PRIVIND PREVIZIUNILE OBȚINUTE PENTRU ÎNTREGUL SET DE SUBSTANȚE CHIMICE

(n = 80 de substanțe chimice testate în cadrul a două serii independente pentru epiCS ® sau a trei serii independente pentru EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ și SkinEthic™, și anume, 159 (*) sau, respectiv, 240 de clasificări)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Supraclasificări:				
1B și 1C supraclasificate 1A	21,50 %	29,0%	31,2%	32,8%
MN supraclasificat 1B și 1C	20,7%	23,4%	27,0 %	28,4 %
MN supraclasificat 1A	0,00%	2,7%	0,0 %	0,00%
Corecție de supraclasificare	20,7%	26,1%	27,0%	28,4%
Rata globală de supraclasificare (toate categoriile)	17,9%	23,3%	24,5%	25,8%
Subclasificări:				
1A supraclasificat 1B și 1C	16,7%	16,7 %	16,7%	12,5 %
1A subclasificate MN	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1B și 1C supraclasificate MN	2,2%	0,00%	7,5%	6,6%
Rata globală de subclasificare (toate categoriile)	3,3%	2,5%	5,4%	4,4%
Clasificări corecte:				
1A clasificate în mod corect	83,3%	83,3%	83,3%	87,5%
1B și 1C clasificate în mod corect	76,3%	71,0%	61,3%	60,7%
MN clasificat în mod corect	79,3%	73,9%	73,0%	71,62%
Precizie totală	78,8%	74,2%	70%	69,8%

MN: Necoroziv

(*) o substanță chimică a fost testată o singură dată cu epiSC® datorită indisponibilității (23)

▼**M8**

Apendicele 4

Parametrii cheie și criteriile de acceptare pentru calificarea unui sistem de spectrometrie HPLC/UPLC pentru măsurarea formazanului MTT extras din țesutul RhE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (37) (38)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, probă vie (extras de izopropanol din țesuturi RhE vii fără tratament), probă moartă (extras de izopropanol din țesuturile RhE moarte fără tratament)	$Zonă_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$ ([1])
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ efectul de matrice % ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard $ULOQ^2$ ([2])	$Zona_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de la stocare la o temperatură specifică (de exemplu, 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită a fi de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi, și anume 200 µg/ml.

▼B

B.41. TESTUL DE FOTOTOXICITATE 3T3 NRU *IN VITRO*

1. METODĂ

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 432 (2004) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Fototoxicitatea se definește ca o reacție toxică datorată aplicării unei substanțe pe corp, declanșată sau accentuată (și vizibilă în cazul unor doze mici) după o expunere ulterioară la lumină sau indusă prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unei substanțe.

Testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* se folosește pentru identificarea potențialului fototoxic al unei substanțe testate, indus de substanța chimică după expunerea la lumină. Testul evaluează fotocitotoxicitatea prin reducerea relativă a viabilității celulelor expuse la substanța respectivă în prezența sau în absența luminii. Substanțele identificate prin acest test pot fi fototoxice *in vivo* după aplicare sistemică și distribuție în piele sau după aplicare locală.

S-au semnalat efecte fototoxice pentru multe tipuri de substanțe chimice (1) (2) (3) (4). Trăsătura comună a acestor substanțe este capacitatea de a absorbi energia luminoasă din gama luminii solare. Conform primei legi din fotochimie (legea lui Grotthaus-Draper), reacția fotochimică necesită absorbția unui număr suficient de cuante de lumină. Astfel, înainte de a se avea în vedere realizarea unui test biologic, se recomandă determinarea unui spectru de absorbție UV/vizibil a produsului chimic analizat, conform liniei directoare 101 a OCDE pentru teste. În cazul în care un coeficient de extincție/absorbție molară este mai mic de 10 litri × mol^{-1} × cm^{-1}, acel produs chimic nu deține potențial fotoreactiv. Nu este necesar ca un astfel de produs chimic să fie supus testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* sau oricărui alt test biologic destinat detectării efectelor fotochimice adverse (1) (5). A se vedea, de asemenea, apendicele 1.

Importanța și fiabilitatea testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* au fost evaluate recent (6) (7) (8) (9). S-a dovedit că testul de fototoxicitate 3T3 NRU oferă posibilitatea de a anticipa efectele fototoxicității acute *in vivo* la oameni și animale. Testul nu este destinat să anticipeze alte efecte adverse care ar putea apărea în urma acțiunii combinate a unui produs chimic și a luminii, precum fotogenotoxicitatea, fotoalergia și fotocancerigenitatea și nici nu evaluează puterea fototoxică. În plus, testul nu este conceput pentru a determina mecanismele indirecte ale fototoxicității, efectele metaboliților substanței de testare sau efectele amestecurilor.

În timp ce utilizarea sistemelor de metabolizare este o cerință generală pentru toate testele *in vitro* utilizate pentru estimarea potențialului genotoxic și cancerigen, până în prezent, în cazul fototoxicologiei, se cunosc puține exemple în care este necesară o transformare metabolică, astfel încât substanța chimică să acționeze ca o fototoxină *in vivo* sau *in vitro*. Astfel, efectuarea prezentului test cu un sistem de activare metabolică nu se consideră nici necesară și nici nu se justifică din punct de vedere științific.

▼B

1.2. DEFINIȚII

Iradianță: intensitatea luminii ultraviolete (UV) sau vizibile, incidente pe o suprafață, măsurată în W/m^2 sau mW/cm^2.

Doză de lumină: cantitatea (= intensitate × timp) de lumină ultravioletă (UV) sau vizibilă, incidentă pe o suprafață, exprimată în jouli (= W × s) pe unitate de suprafață, de exemplu J/m^2 sau J/cm^2.

Benzi de lungimi de undă a luminii UV: specificațiile recomandate de CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) sunt: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) și UVC (100-280 nm). Se utilizează, de asemenea, și alte specificații: limita dintre UVB și UVA este plasată adesea la 320 nm, iar UVA se poate diviza în UV-A1 și UV-A2, cu o limită situată la aproximativ 340 nm.

Viabilitate celulară: parametru care măsoară întreaga activitate a unei populații celulare (de exemplu absorbția colorantului vital roșu neutru în lizozomii celulari), care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor.

Viabilitate celulară relativă: viabilitatea celulară exprimată în funcție de probele solvente (negative) prelevate pe toată durata realizării testului (fie + Irr, fie – Irr), dar care nu au fost tratate cu un produs chimic.

PIF (Photo-Irritation Factor) (factor de fotoiritare): factor obținut prin compararea a două concentrații citotoxice la fel de eficiente (IC_{50}) ale produsului chimic testat obținute în absența (– Irr) și în prezența (+ Irr) unei iradieri necitotoxice cu lumină UV/vizibilă.

IC_{50}: concentrația produsului chimic testat prin care viabilitatea celulară se reduce cu 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect) (fotoefect mediu): măsură rezultată din analiza matematică a două curbe concentrație-răspuns obținute în absența (– Irr) și în prezența (+ Irr) unei iradieri necitotoxice cu lumină UVA/vizibilă.

Fototoxicitate: reacție toxică acută care apare după o primă expunere a pielii la anumite produse chimice și expunere ulterioară la lumină sau care este indusă în mod similar prin iradierea pielii după administrarea sistemică a unui produs chimic.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* se bazează pe o comparație a citotoxicității unui produs chimic atunci când este testat cu expunere sau fără expunere la o doză necitotoxică de lumină solară simulată. În prezentul test, citotoxicitatea se exprimă printr-o diminuare, în funcție de concentrație, a colorantului vital roșu neutru (NR) fixat (9) după 24 de ore de la tratarea cu produsul chimic testat și iradierea acestuia (10). Colorantul roșu neutru este un cation slab care penetrează imediat membranele celulare prin nedifuziune acumulându-se intracelular în lizozomi. Modificarea suprafeței sensibile a membranei lizozomilor duce la o fragilitate a acestora și la alte modificări care, gradual, devin ireversibile. Aceste schimbări produse de acțiunea xenobioticelor duc la o diminuare a fixării colorantului roșu neutru. Astfel, se poate face distincția între celulele viabile, deteriorate sau moarte, fapt ce reprezintă însăși fundamentul acestui test.

▼B

Celulele Balb/c 3T3 sunt păstrate în cultură timp de 24 ore pentru formarea monostraturilor. Pentru fiecare produs chimic testat, sunt preincubate două plăci cu 96 de godeuri, cu opt concentrații diferite ale substanței de testare, timp de 1 oră. Ulterior, una dintre cele două plăci este expusă la cea mai înaltă doză de iradiere necitotoxică, iar cealaltă placă se păstrează la întuneric. În ambele plăci, mediul de tratare este înlocuit, ulterior, cu mediul de cultură și după alte 24 de ore de incubare, se determină viabilitatea celulară prin fixarea colorantului roșu neutru. Viabilitatea celulară este exprimată în procent de probe martor solvente netratate și se calculează pentru fiecare concentrație de testare. Pentru estimarea potențialului fotoxic, se compară răspunsurile la concentrații, obținute în prezența și absența iradierii, de obicei la nivelul IC_{50}, respectiv la concentrația care reduce viabilitatea celulară cu 50 % față de probele martor netratate.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Etape pregătitoare**

1.4.1.1. *Celule*

În studiul de validare s-a utilizat o linie permanentă de celule fibroblaste de șoarece – Balb/c 3T3, clona 31 – provenind fie de la ATCC (American Type Culture Collection) Manassas, VA, SUA, fie de la ECACC (European Collection of Cell Cultures) Salisbury, Wiltshire, UK și, prin urmare se recomandă ca celulele să provină de la un depozit de celule calificat corespunzător. Dacă se adaptează condițiile de cultură la nevoile specifice ale celulelor, se pot utiliza cu succes alte celule sau linii celulare pentru aceeași procedură de testare, cu condiția demonstrării echivalenței.

Celulele trebuie controlate cu regularitate pentru a verifica absența contaminării acestora cu micoplasmă și trebuie utilizate numai dacă rezultatele acestui control sunt satisfăcătoare (11).

Este important ca sensibilitatea celulelor la UVA să fie controlată în mod regulat, conform procedurii pentru controlul calității descrisă în prezenta metodă. Datorită faptului că sensibilitatea celulelor la UVA poate să crească o dată cu numărul de reînsămânțări, ar trebui să se utilizeze celulele Balb/c 3T3 cu cel mai mic număr de reînsămânțări posibile, de preferință mai mic de 100 (a se vedea punctul 1.4.2.2.2 și apendicele 2).

1.4.1.2. *Medii și condiții de cultură*

Se recomandă utilizarea unor medii de cultură și a unor condiții de incubare corespunzătoare pentru reînsămânțarea sistematică a celulelor și în timpul procedurii de testare. De exemplu, pentru celulele Balb/c 3T3, mediul de cultură este DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) la care s-a adăugat 10 % ser de vițel nou-născut, 4 mM de glutamină, penicilină (100 IU), și streptomicină (100 µg/ml), incubarea în atmosferă umidificată la 37 °C, 5-7,5 % CO_2,, în funcție de tampon (a se vedea punctul 1.4.1.4, al doilea paragraf). Este foarte important ca aceste condiții de cultură celulară să asigure o durată a ciclului celular într-un interval normal pentru celulele sau linia celulară utilizată.

1.4.1.3. *Pregătirea culturilor*

Celulele din stocul de culturi congelate se însămânțează într-un mediu de cultură la o densitate corespunzătoare și se reînsămânțează cel puțin o dată înainte de a fi folosite pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro.*

▼B

Celulele folosite pentru testul de fototoxicitate sunt însămânțate în mediul de cultură la densitatea corespunzătoare, astfel încât culturile să nu ajungă la confluență înainte de terminarea testului, respectiv atunci când se determină viabilitatea celulară după 48 de ore de la însămânțarea celulelor. Pentru celulele Balb/c 3T3 cultivate pe plăci cu 96 de godeuri, densitatea celulară recomandată este de 1×10^4 celule pe godeu.

Pentru fiecare substanță chimică testată, celule sunt însămânțate în mod identic pe două plăci separate, cu câte 96 de godeuri, utilizate ulterior, în mod concomitent pe toată durata procedurii de testare, în condiții de cultură identice, cu excepția intervalului de timp în care o placă este iradiată (+ Irr) și cealaltă este păstrată la întuneric (– Irr).

1.4.1.4. *Pregătirea substanțelor de testare*

Substanțele de testare trebuie să fie proaspăt preparate, chiar înaintea utilizării, cu excepția cazului în care există date care dovedesc stabilitatea acestora în timpul depozitării. Se recomandă ca manipularea tuturor substanțelor chimice, precum și tratarea inițială a celulelor să se efectueze în condiții de luminozitate care să evite fotoactivarea sau degradarea substanței de testare înaintea iradierii.

Substanțele chimice testate trebuie dizolvate în soluții saline tamponate, de exemplu soluție salină echilibrată Earl (Earle's Balanced Salt Solution – EBSS) sau alte soluții tampon echilibrate fiziologic, care nu trebuie să conțină componente proteice și care absorb lumina (de exemplu indicatori de pH colorați și vitamine), în vederea evitării interferenței în timpul iradierii. Din moment ce, în timpul iradierii, celulele sunt ținute timp de aproximativ 50 de minute în afara incubatorului CO_2, trebuie luate măsuri pentru a evita alcalinizarea. Aceasta se poate realiza prin incubarea celulelor la 7,5 % CO_2, în cazul în care se folosesc tampoane slabe ca EBSS. Dacă celulele sunt incubate la doar 5 % CO_2, se va selecta un tampon mai puternic.

Substanțele chimice de testare cu solubilitate limitată în apă trebuie dizolvate într-un solvent corespunzător. În cazul în care se utilizează un anumit solvent, acesta trebuie să fie prezent în volum constant în toate culturile, respectiv în probele negative (solvent), precum și în toate concentrațiile substanței chimice testate și să fie necitotoxic în concentrația utilizată. Concentrațiile soluțiilor de testat ar trebui selectate astfel încât să se evite precipitarea sau soluțiile în suspensie.

Solvenții recomandați sunt dimetilsulfoxidul (DMSO) și etanolul (EtOH). Pot fi adecvați și alți solvenți cu citotoxicitate redusă (de exemplu acetona). Se recomandă ca, înainte de utilizare, să se efectueze o evaluare atentă a proprietăților specifice ale tuturor solvenților, de exemplu reacția cu substanța chimică testată, atenuarea efectului fototoxic, proprietățile de fixare a radicalilor și/sau stabilitatea chimică în solvent.

Pentru facilitarea solubilizării, se pot utiliza agitatorul Vortex, dezintegrarea cu ultrasunete și/sau încălzirea la temperaturi adecvate, cu condiția ca stabilitatea substanței testate să nu fie afectată.

▼B

1.4.1.5. *Condiții de iradiere*

1.4.1.5.1. Sursa de lumină

Alegerea unei surse de lumină și a unei filtrări corespunzătoare reprezintă factorul principal pentru testarea fototoxicității. Gama UVA și de lumină vizibilă sunt asociate, de obicei, reacțiilor fototoxice *in vivo* (3) (12), în timp ce, în general, gama UVB este mai puțin importantă, dar este foarte citotoxică; citotoxicitatea crește de o mie de ori pe măsură ce lungimea de undă trece de la 313 nm la 280 nm (13). Criteriile pentru alegerea unei surse corespunzătoare de lumină trebuie să includă cerința ca sursa de lumină să emită lungimi de undă absorbite de substanța chimică testată (spectru de absorbție) și ca doza de lumină (care se poate obține într-un timp de expunere rezonabil) să fie suficientă pentru detectarea substanțelor fotocitotoxice cunoscute. În plus, lungimile de undă și dozele utilizate nu ar trebui să dăuneze în mod nejustificat sistemului, de exemplu emisia de căldură (regiunea infraroșu).

Simularea luminii solare cu simulatori solari este considerată sursa optimă de lumină artificială. Distribuția puterii de iradiere a simulatorului solar cu filtru trebuie să fie apropiată de cea a luminii exterioare naturale menționate la punctul (14). Se utilizează ca simulatoarele solare atât arcurile cu xenon, cât și arcurile (dopate) cu halogenuri din mercur/metalice. Acestea din urmă prezintă avantajul că emit mai puțină căldură și sunt mai ieftine, dar reproducerea luminii solare este inferioară în comparație cu arcurile cu xenon. Deoarece toate simulatoarele solare emit cantități importante de UVB, ar trebui să fie dotate cu filtre corespunzătoare pentru atenuarea lungimilor de undă UVB puternic citotoxice. Deoarece materialele plastice pentru culturile de celule conțin stabilizatori UV, spectrul al trebui măsurat cu ajutorul aceluiași tip de placă cu 96 de godeuri, utilizat la testare. Indiferent de măsurile luate pentru atenuarea unor părți din spectru prin filtrare sau prin efecte inevitabile de filtrare a echipamentului, spectrul înregistrat sub aceste filtre nu trebuie să devieze de la lumina naturală, exterioară, standardizată (14). Un exemplu de distribuție a iradianței spectrale a simulatorului solar cu filtru, utilizat în studiul de validare a testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro,* a fost publicat în (8) (16). A se vedea, de asemenea, apendicele 2 figura 1.

1.4.1.5.2. Dozimetrie

Intensitatea luminii (iradianța) ar trebui controlată în mod regulat înaintea fiecărui test de fototoxicitate, folosind un radiometru UV corespunzător, cu bandă largă. Intensitatea trebuie măsurată cu ajutorul aceluiași tip de placă cu 96 de godeuri, care va fi utilizat la testare. Radiometrul UV trebuie să fie calibrat în funcție de sursă. Performanța radiometrului UV ar trebui verificată, recomandându-se utilizarea unui al doilea radiometru de referință pentru măsurarea UV, de același tip, calibrat în mod identic. În mod ideal, la intervale mai mari, ar trebui utilizat un spectroradiometru pentru măsurarea iradianței spectrale a sursei de lumină filtrate și controlul calibrării radiometrului UV cu bandă largă.

S-a stabilit că o doză de 5 J/cm^2 (măsurată în gama UVA) nu este citotoxică pentru celulele Balb/c 3T3, fiind suficient de puternică pentru a excita chiar și substanțele chimice pentru a obține reacții fototoxice (6) (17). De exemplu, pentru a obține 5 J/cm^2 în 50 de minute, iradianța a fost reglată la 1,7 mW/cm^2. A se vedea apendicele 2, figura 2. Dacă se utilizează o altă linie de celule sau o sursă diferită de lumină, calibrarea dozei de iradianță poate fi necesară astfel încât doza respectivă să nu fie nocivă pentru celule, dar să fie suficientă pentru a excita fototoxinele standard. Timpul de expunere la lumină se calculează astfel:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{doza de irandianță } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irandianță } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ J = 1\ Ws)$$

1.4.2. **Condiții de testare**

1.4.2.1. *Concentrații ale substanțelor de testare:*

Gama concentrațiilor unei substanțe chimice testate în prezența (+ Irr) și în absența (–Irr) luminii ar trebui determinate corespunzător prin experimente pentru aflarea dozelor. S-ar putea dovedi folositoare evaluarea solubilității, la început și după 60 de minute (sau după intervalul de timp utilizat pentru tratare), deoarece solubilitatea se poate modifica în timp sau pe durata expunerii. Pentru a evita toxicitatea provocată de condițiile necorespunzătoare de cultură sau de substanțele chimice puternic acide ori alcaline, pH-ul culturilor de celule la care s-a adăugat substanța chimică testată ar trebui să se încadreze în limitele 6,5-7,8.

Cea mai mare concentrație a substanței testate trebuie să se încadreze în condițiile fiziologice de testare, de exemplu trebuie evitat pH-ul osmotic și de stres. În funcție de substanța chimică testată, ar putea fi necesar să se aibă în vedere și alte proprietăți fizico-chimice ca factori importanți în limitarea celei mai mari valori a concentrației de test. În ceea ce privește substanțele relativ insolubile netoxice la concentrații care merg până la punctul de saturație, ar trebui testată cea mai mare concentrație care poate fi atinsă. În general, trebuie evitată precipitarea substanței chimice de testare la oricare dintre concentrațiile de testare. Concentrația maximă a unei substanțe de test nu trebuie să depășească 1 000 μg/ml; osmolaritatea nu ar trebui să depășească 10 mmolar. Ar trebui utilizată o serie de diluții geometrice incluzând 8 concentrații ale substanței testate cu un factor constant de diluție (a se vedea punctul 2.1 al doilea paragraf).

Dacă s-a obținut informația (pe baza unui experiment de identificare a limitelor) că substanța testată nu este citotoxică până la limita de concentrație a experimentului la întuneric (– Irr), dar că este puternic citotoxică la lumină (+ Irr), limitele concentrației care trebuie selectate pentru experimentul la lumină (+ Irr) pot fi diferite de limitele selectate pentru experimentul la întuneric (– Irr), în vederea îndeplinirii cerințelor privind calitatea corespunzătoare a datelor.

1.4.2.2. *Controale*

1.4.2.2.1. Sensibilitatea celulelor la radiații, stabilirea datelor anterioare

Celulele ar trebui verificate în mod regulat (aproximativ la fiecare a cincea reînsămânțare), în ceea ce privește sensibilitatea la sursa de lumină, evaluând viabilitatea acestora în urma expunerii la doze din ce în ce mai mari de iradiere. Pentru această evaluare, trebuie folosite mai multe doze de iradiere, inclusiv niveluri semnificativ mai ridicate decât cele utilizate pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU. Metoda cea mai simplă de cuantificare a acestor doze constă în măsurarea spectrului UV din sursa de lumină. Celulele sunt însămânțate la densitatea utilizată pentru testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro* și iradiate în ziua următoare. Ulterior, viabilitatea celulară se determină o zi mai târziu, utilizând fixarea colorantului roșu neutru. Trebuie să se demonstreze că cea mai mare doză necitotoxică rezultată (de exemplu în studiul de validare: 5 J/cm^2 [UVA]) este suficientă pentru a clasifica, în mod corect, substanțele chimice de referință (tabelul 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilitatea la radiații, verificarea testului în curs

Testul îndeplinește criteriile de calitate dacă probele negative/solvente iradiate indică o viabilitate mai mare de 80 % în comparație cu probele negative/solvente neiradiate.

1.4.2.2.3. Viabilitatea probelor de solvent

Densitatea optică absolută ($DO_{540\ NRU}$) din colorantul roșu neutru extras din probele de solvent indică dacă cele 1×10^4 celule însămânțate per godeu s-au dezvoltat cu un timp de dublare normal în cele două zile de testare. Testul îndeplinește criteriile de acceptare dacă media $DO_{540\ NRU}$ pentru probele netratate este $\geq 0{,}4$ (aproximativ de douăzeci de ori absorbanța de bază a solventului).

1.4.2.2.4. Controlul pozitiv

O substanță chimică fototoxică cunoscută este testată în același timp cu fiecare test de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*. Se recomandă clorpromazinul (CPZ). Pentru CPZ testat conform procedurii standard în testul de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*, s-au stabilit următoarele criterii de acceptare a testului: CPZ iradiată (+ Irr): IC_{50} = 0,1-2,0 µg/ml, CPZ neiradiată (– Irr): IC_{50} = 7,0-90,0 µg/ml. Factorul de fotoiritare (PIF) ar trebui să fie > 6. Datele controlului pozitiv trebuie monitorizate.

În locul clorpromazinului se pot utiliza ca probe pozitive simultane și alte substanțe chimice fototoxice, care corespund clasei de substanțe chimice sau caracteristicilor de solubilitate ale substanței chimie evaluate.

1.4.3. **Procedura de testare (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1. *Prima zi*

Se varsă 100 µl mediu de cultură în godeurile periferice ale unei plăci de microtitru de cultură tisulară cu 96 de godeuri (= goale). În celelalte godeuri se varsă 100 µl dintr-o suspensie celulară de 1×10^5 celule/ml în mediul de cultură (= 1×10^4 celule/godeu). Se pregătesc două plăci pentru fiecare serie de concentrații ale substanței de testare, precum și pentru probele pozitive și de solvent.

Se incubează celulele timp de 24 de ore (a se vedea punctul 1.4.1.2) până când formează un monostrat semiconfluent. Această perioadă de incubare permite recuperarea, aderența și creșterea exponențială a celulei.

1.4.3.2. *A doua zi*

După incubație, se decantează mediul de cultură din celule și se spală cu atenție cu 150 µl din soluția tampon folosită pentru incubație. Se adaugă 100 µl de soluție tampon cu o concentrație adecvată a substanței chimice de testare sau a solventului (solvent de control). Se aplică 8 concentrații diferite din substanța chimică de testare. Se incubează celulele cu substanța de testare la întuneric timp de 60 de minute (a se vedea punctul 1.4.1.2 și punctul 1.4.1.4 paragraful al doilea).

Dintre cele două plăci pregătite pentru fiecare serie de concentrații ale substanței de testare și ale probelor de control, se selectează una, în general în mod aleatoriu, pentru a se determina citotoxicitatea (– Irr) (de exemplu, placa de control), iar cealaltă (placa de tratare) pentru determinarea fotocitotoxicității (+ Irr).

▼B

Pentru realizarea expunerii la + Irr, se iradiază celulele la temperatura camerei timp de 50 de minute, prin capacul plăcii, cu cea mai mare doză de radiație necitotoxică (a se vedea, de asemenea, apendicele 2). Plăcile neiradiate (– Irr) se păstrează la temperatura camerei, într-o cutie închisă, timp de 50 de minute (= timpul de expunere la lumină).

Se decantează soluția de testare și se spală cu atenție, de două ori, cu 150 µl din soluția tampon folosită pentru incubație, dar care nu conține substanța de testare. Se înlocuiește soluția tampon cu mediul de cultură și se incubează (a se vedea punctul 1.4.1.2) peste noapte (18-22 ore).

1.4.3.3. *A treia zi*

1.4.3.3.1. Evaluarea microscopică

Pentru examinarea celulelor din punct de vedere al dezvoltării, morfologiei și integrității monostratului trebuie utilizat un microscop cu contrast de fază. Se înregistrează modificările apărute în morfologia celulei și efectele asupra dezvoltării celulei.

1.4.3.3.2. Testul de fixare a colorantului roșului neutru

Se spală celulele cu 150 µl de soluție tampon încălzită în prealabil. Soluția de spălare se îndepărtează prin tamponare ușoară. Se adaugă 100 µl de soluție de roșu neutru 50 µg/ml (RN) (clorhidrat de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin, număr EINECS 209-035-8; număr CAS 553-24-2; C.I. 50040) în mediu fără ser (16) și se incubează conform descrierii de la punctul 1.4.1.2, timp de 3 ore. După incubație, se îndepărtează mediul de RN și se spală celulele cu 150 µl de soluție tampon. Se decantează, iar surplusul de soluție tampon se îndepărtează cu un material absorbant sau prin centrifugare.

Se adaugă exact 150 µl de soluție RN de desorbție (preparată proaspăt din 49 părți apă + 50 părți etanol + 1 parte acid acetic).

Se agită ușor placa de microtitru pe un aparat de agitare pentru plăcile de microtitru timp de 10 minute, până când roșul neutru este extras din celule și formează o soluție omogenă.

Se măsoară densitatea optică a extrasului de roșu neutru la 540 nm într-un spectrofotometru, utilizându-se godeurile goale ca puncte de referință. Pentru analize ulterioare, datele se salvează într-un fișier electronic corespunzător.

2. **DATE**

2.1. CALITATEA ȘI CANTITATEA DATELOR

Datele testului trebuie să permită o analiză semnificativă relațiilor concentrație-răspuns obținute în prezența și în absența iradierii și, dacă este posibil, o identificare a concentrației substanței chimice de testare la care viabilitatea celulară este redusă la 50 % (IC_{50}). Dacă se constată o citotoxicitate, atât gama de concentrații cât și intervalul între fiecare concentrație trebuie stabilite astfel încât să permită adaptarea unei curbe la datele experimentale.

Atât pentru rezultatele clar pozitive, cât și pentru cele clar negative (a se vedea punctul 2.3, primul paragraf), experimentul principal poate fi suficient, însoțit de unul sau mai multe experimente preliminare de identificare a gamei de doze.

▼B

Rezultatele echivoce, la limită sau neclare trebuie clarificate prin testări suplimentare (a se vedea, de asemenea, punctul 2.4 al doilea paragraf). În astfel de cazuri, trebuie luată în considerare modificarea condițiilor de testare. Condițiile de testare care ar putea fi modificate includ: gama de concentrații sau distanța dintre ele, timpul de preincubare, precum și timpul de expunere la iradiere. Pentru substanțele chimice instabile în apă, poate fi mai adecvat un timp de expunere mai scurt.

2.2. EVALUAREA REZULTATELOR

Pentru a facilita evaluarea datelor, se poate calcula factorul de fotoiritare (PIF) sau fotoefectul mediu (MPE).

Pentru calcularea măsurilor de fotocitotoxicitate (a se vedea mai jos), setul valorilor concentrație-răspuns distincte trebuie aproximat printr-o curbă concentrație-răspuns continuă corespunzătoare (model). Adaptarea curbei la date se realizează în mod obișnuit printr-o metodă de regresie neliniară (18). Pentru a estima influența variabilității datelor asupra curbei adaptate, se recomandă o procedură de „bootstrap”.

Factorul de fotoiritare (PIF) se calculează folosind următoarea formulă:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Dacă IC_{50} în prezența sau în absența luminii nu se poate calcula, nici PIF pentru substanța de testare nu poate fi determinat. Fotoefectul mediu (MPE) se bazează pe comparația curbelor concentrație-răspuns complete (19). Acesta este definit ca media ponderală a unui set reprezentativ de valori ale fotoefectului.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoefectul PE_c, la o concentrație oarecare C este definit ca produsul dintre efectul de răspuns RE_c și efectul de doză DE_c, respectiv $PE_c = RE_c \times DE_c$. Efectul de răspuns RE_c reprezintă diferența dintre răspunsurile obținute în absența și în prezența luminii, respectiv $RE_c = R_c$ (– Irr) – R_c (+ Irr). Efectul de doză este dat de formula:

$$DE_c = \left|\frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1}\right|$$

unde C* reprezintă concentrația de echivalență, respectiv concentrația la care răspunsul + Irr este egal cu răspunsul la – Irr la concentrația C. Dacă C* nu poate fi determinat din cauză că valorile de răspuns ale curbei + Irr sunt, în mod constant, mai mari sau mai mici decât de R_C (– Irr), efectul de doză este stabilit la valoarea 1. Factorii de ponderare w_i rezultă din valoarea de răspuns cea mai mare, respectiv, w_i = MAX {R_i (+ Irr), R_i (– Irr)}. Grila de concentrații C_i este selectată astfel încât același număr de puncte să figureze în fiecare dintre intervalele de concentrații definite de valorile de concentrații utilizate în experiment. Calculul MPE se limitează la valoarea maximă a concentrației pentru care cel puțin una dintre cele două curbe indică o valoare de răspuns de minim 10 %. Dacă această concentrație maximă este mai mare decât cea mai mare concentrație utilizată în experimentul + Irr, partea rămasă din curba + Irr se fixează la valoarea de răspuns „0”. Substanța chimică este clasificată drept fototoxică în funcție de valoarea MPE, mai mare sau nu decât o valoare limită selectată corespunzător (MPE_c = 0,15).

▼B

Pentru calcularea PIF și MPE, referința (20) pune la dispoziție un pachet de programe.

2.3. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Pe baza studiului de validare (8), substanța de testare cu un PIF < 2 sau un MPE < 0,1 indică: „absența fototoxicității”. Un PIF > 2 și < 5 sau un MPE > 0,1 și < 0,15 indică: „fototoxicitate probabilă”, iar un PIF > 5 sau un MPE > 0,15 indică: „fototoxicitate”.

În cazul laboratoarelor care efectuează acest test pentru prima dată, substanțele de referință menționate în tabelul 1 trebuie testate înainte de evaluarea fototoxicității substanțelor de testare. Valorile PIF sau MPE trebuie să fie apropiate de valorile menționate în tabelul 1.

Tabelul 1

Denumirea chimică	Nr. EINECS	Nr. CAS	PIF	MPE	Punctul maxim de absorbție	Solvent ([1])
Amiodaronă HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (prag)	etanol
Clorpromazin HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfirină IX de disodiu	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-Histidină		[7006-35-1]	fără PIF	0,05-0,10	211 nm	apă
Hexaclorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (prag)	etanol
Lauril sulfat de sodiu	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	fără absorbție	apă

([1]) Solventul utilizat pentru măsurarea absorbției.

2.4. INTERPRETAREA DATELOR

Dacă efectele fototoxice sunt observate doar la cea mai mare concentrație de testare, (în special pentru substanțele chimice solubile în apă), poate fi necesar să se ia în considerare alte elemente pentru evaluarea riscurilor, precum date privind absorbția cutanată, acumularea substanțelor chimice în piele și/sau date obținute de la alte teste, cum ar fi testarea substanței chimice *in vitro*, pe piele umană sau animală sau pe alte modele de piele.

▼B

Dacă nu se demonstrează existența toxicității (+ Irr și – Irr) și dacă solubilitatea scăzută a limitat concentrațiile care puteau fi testate, atunci se poate pune sub semnul întrebării compatibilitatea substanței de testate cu testul, fiind util să se ia în considerare efectuarea unui test de confirmare utilizând, de exemplu, un alt model.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța testată:

— datele de identificare, denumirile generice comune și numerele IUPAC și CAS, dacă se cunosc;

— starea fizică și puritatea;

— proprietățile fizico-chimice relevante pentru efectuarea studiului;

— spectrul de absorbție UV/vizibilă;

— stabilitatea și fotostabilitatea, dacă se cunosc.

Solventul:

— justificarea alegerii solventului;

— solubilitatea substanței chimice testate în solvent;

— procentul de solvent prezent în mediul de tratare.

Celulele:

— tipul și sursa celulelor;

— absența micoplasmei;

— numărul de reînsămânțare al celulelor, dacă se cunoaşte;

— sensibilitatea celulelor la radiații, stabilită cu aparatul de iradiere utilizat în cadrul testului de fototoxicitate 3T3 NRU *in vitro*.

Condițiile de testare (1); *incubația înainte și după tratare:*

— tipul și compoziția mediului de cultură;

— condițiile de incubare (concentrația de CO_2; temperatura; umiditatea);

— durata incubației (înainte și după tratare).

Condițiile de testare (2); *tratare cu substanța chimică:*

— motivele selectării concentrațiilor substanței chimice de testare utilizate în prezența și în absența iradierii;

— în cazul unei solubilități limitate a substanței de testare și a absenței cititoxicității: motivul testării celei mai ridicate concentrații;

— tipul și compoziția mediului de tratare (soluție salină tampon);

— durata tratării chimice.

Condiții de testare (3); *iradierea*:

— motivul pentru alegerea sursei de lumină utilizate;

▼B

— producătorul și tipul sursei de lumină și a radiometrului;

— caracteristicile de iradiere spectrală ale sursei de lumină;

— caracteristicile de transmisie și absorbție ale filtrului (filtrelor) utilizat(e);

— caracteristicile radiometrului și detaliile privind calibrarea acestuia;

— distanța dintre sursa de lumină și sistemul de testare;

— iradierea UVA la această distanță, exprimată în mW/cm^2;

— durata expunerii la lumină UV/vizibilă;

— doza de UVA (iradiere × timp), exprimată în J/cm^2;

— temperatura culturilor de celule în timpul iradierii și a culturilor de celule ținute concomitent la întuneric.

Condiții de testare (4); *testul de viabilitate cu roșu neutru:*

— compoziția mediului de tratare cu roșu neutru;

— durata de incubație a roșului neutru;

— condițiile de incubație (concentrația de CO_2, temperatura, umiditatea);

— condițiile de extragere a roșului neutru (soluția de extragere, durata);

— lungimea de undă utilizată pentru citirea spectrofotometrică a densității optice a roșului neutru;

— a doua lungime de undă (referință), dacă este utilizată;

— conținutul spațiului liber al spectrofotometrului, dacă este utilizat.

Rezultate:

— viabilitatea celulară obținută la fiecare concentrație a substanței chimice de testare, exprimată în viabilitatea procentuală medie a probelor de solvent simultane;

— curbele concentrație-răspuns (concentrația substanței chimice de testare comparată cu viabilitatea celulară relativă) obținute în experimente simultane + Irr și – Irr;

— analiza curbelor concentrație-răspuns: dacă este posibil, estimarea/calcularea IC_{50} (+ Irr) și IC_{50} (– Irr);

— compararea celor două curbe concentrație-răspuns obținute în prezența și în absența iradierii, fie prin calcularea factorului de fotoiritare (PIF), fie prin calcularea fotoefectului mediu (MPE);

— criteriile de acceptare a testului, solvent de control simultan:

— viabilitatea absolută (densitatea optică a extrasului de roșu neutru) a celulelor iradiate și neiradiate;

— datele istorice privind controalele negativ și de solvent simultane, deviații medii și standard.

— criteriile de acceptare ale testului, control pozitiv simultan:

▼B

— IC_{50} (+ Irr) și IC_{50} (– Irr) și PIF/MPE ale substanței chimice de control pozitiv;

— datele chimice istorice ale controlului pozitiv: IC_{50} (+ Irr) și IC_{50} (– Irr) și PIF/MPE, deviații medii și standard.

Discutarea rezultatelor

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In Vitro* 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

4. Spikes, J. D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology" Edited by K. C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, pp. 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In Vitro* 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In Vitro* 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

11. Hay, R. J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L. A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, pp. 515-530.

13. Tyrrell R. M., Pidoux M. (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H. G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

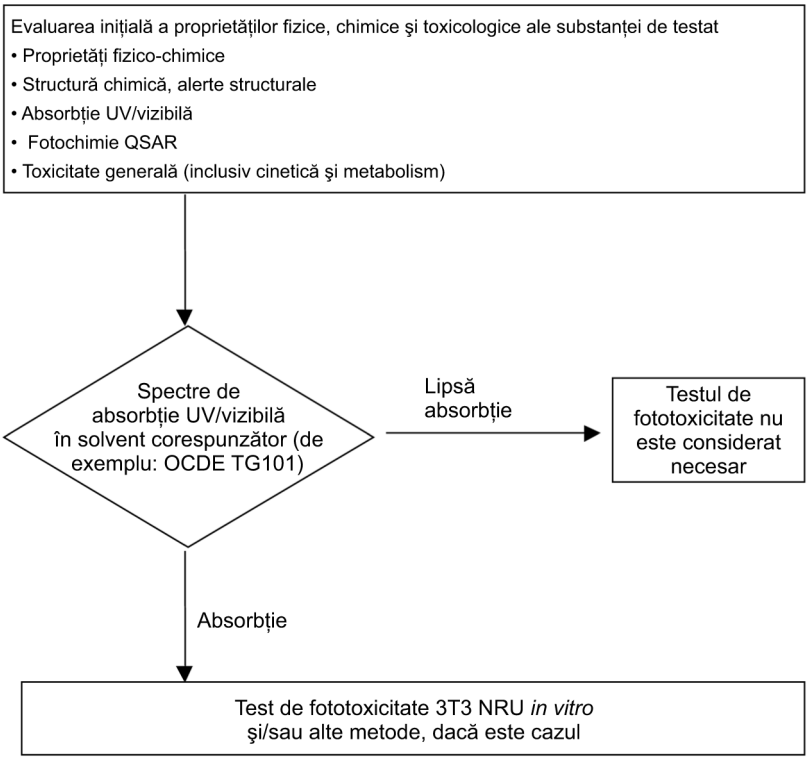
19. Holzhütter, H. G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

APENDICELE 1

Rolul testului de fototoxicitate 3T3 NRU într-o abordare secvențială a testării fototoxicității substanțelor chimice

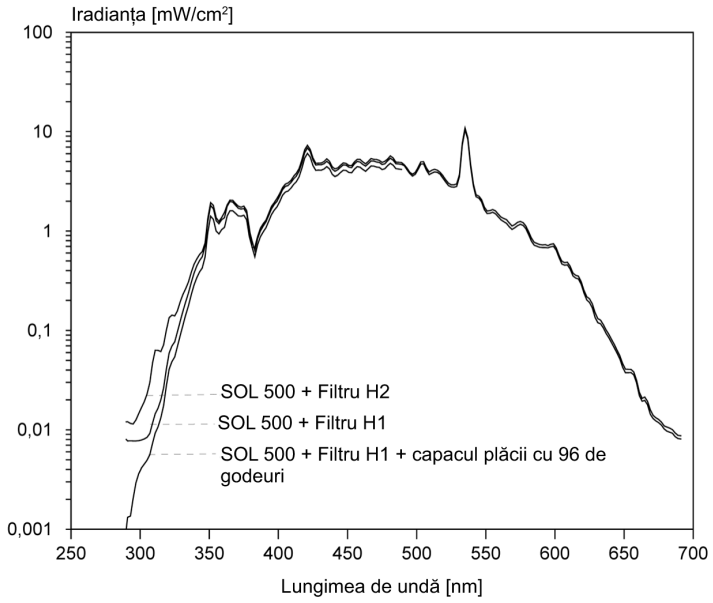


▼B

APENDICELE 2

Figura 1

Distribuția spectrală a iradierii unui simulator solar cu filtru



(a se vedea punctul 1.4.1.5 al doilea paragraf)

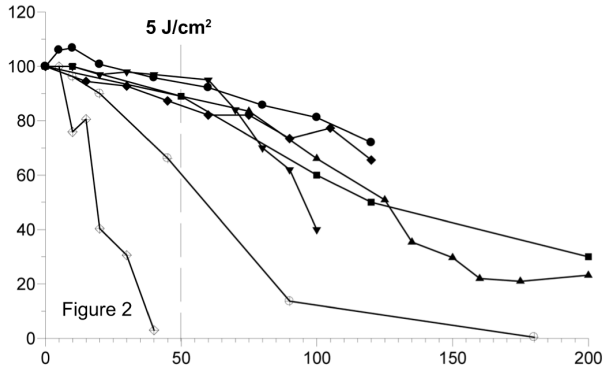
Figura 1 oferă un exemplu al unei distribuții acceptabile de iradiere spectrală pentru un simulator solar cu filtru. Aceasta corespunde sursei de halgenură metalică dopată utilizată în studiul de validare a testului 3T3 NRU (6) (8) (17). Se prezintă efectul a două filtre diferite și efectul de filtrare suplimentară a capacului plăcii de cultură cu 96 de godeuri. Filtrul H2 a fost utilizat doar cu sistemele de testare care pot tolera o cantitate mai mare de UVB (testul pe modelul de piele și testul de fotohemoliză a globulelor roșii). În cadrul testului 3T3 NRU s-a utilizat filtrul H1. Figura arată că efectul de filtrare suplimentară a capacului plăcii se observă în principal în gama UVB, lăsând suficiente raze UVB în spectrul de iradiere pentru a stimula substanțele chimice care absorb în mod obișnuit gama UVB, precum amiodarona (a se vedea tabelul 1).

▼B

Figura 2

Sensibilitatea celulelor Balb/c 3T3 la iradiere (conform măsurătorilor în gama UVA)

Viabilitatea celulară (% de fixare a roşului neutru a probelor de control la întuneric)



(a se vedea punctele 1.4.1.5.2 al doilea paragraf; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Sensibilitatea celulelor Balb/c 3T3 la iradierea cu simulatorul solar utilizat în studiul de validare a testului de fototoxicitate 3T3 NRU, conform măsurătorilor efectuate în gama UVA. Figura prezintă rezultatele obținute în 7 laboratoare diferite în cadrul studiului de prevalidare (1). Cele două curbe cu simboluri deschise la culoare au fost obținute cu celule îmbătrânite (număr mai mare de reînsămânțări) care au trebuit înlocuite cu serii de celule noi, iar curbele cu simboluri îngroșate indică celule cu o toleranță acceptabilă la iradiere.

Pe baza acestor date a fost derivată doza cea mai mare de iradiere necitotoxică de 5 J/cm^2 (linia verticală punctată). Linia orizontală punctată arată, în plus, efectul de iradiere maxim acceptabil menționat la punctul 1.4.2.2.

▼M3

B.42. SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONII LIMFATICI

INTRODUCERE

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, a evoluției necesităților de reglementare și a considerațiilor referitoare la bunăstarea animalelor. Metoda de testare (MT) inițială pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglionii limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429; capitolul B.42 din prezenta anexă), a fost adoptată anterior (1). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). LLNA actualizată se bazează pe evaluarea experienței și a datelor științifice (12). Aceasta este a doua metodă de testare desemnată de evaluare a potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Cealaltă metodă de testare (și anume orientarea OCDE privind testarea nr. 406; capitolul B.6 din prezenta anexă) utilizează teste pe cobai, în special testul de maximizare la cobai și testul Buehler (13). LLNA oferă avantaje comparativ cu B.6 și cu orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13) în ceea ce privește bunăstarea animalelor. Prezenta MT actualizată LLNA include un set de standarde de performanță (SP) (apendicele 1) care pot fi folosite pentru a evalua stadiul de validare a metodelor de testare noi și/sau modificate care sunt similare cu LLNA din punct de vedere funcțional și mecanic, în conformitate cu principiile documentului de orientare nr. 34 al OCDE (14).

2. Testul studiază etapa de inducere a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-efect. Trebuie avut în vedere faptul că agenții de sensibilizare slabi/moderați, recomandați ca substanțe martor pozitiv adecvate pentru metodele de testare pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), sunt adecvați și pentru utilizarea în cadrul LLNA (6) (8) (15). Prezenta metodă de testare descrie, de asemenea, o metodă simplificată a LLNA (rLLNA) opțională, care ar putea utiliza cu până la 40 % mai puține animale (16) (17) (18). rLLNA poate fi utilizată atunci când există o necesitate de reglementare pentru a confirma o estimare negativă a potențialului de sensibilizare dermică, cu condiția să se respecte toate celelalte specificații de protocol LLNA, astfel cum sunt descrise în prezenta MT. Estimarea unui rezultat negativ se bazează pe toate informațiile disponibile descrise la punctul 4. Înainte de a aplica metoda rLLNA, trebuie furnizate justificări științifice clare pentru utilizarea acesteia. În cazul în care, contrar estimărilor, se obține un rezultat pozitiv sau echivoc în cadrul rLLNA, ar putea fi necesare testări suplimentare pentru a interpreta sau clarifica rezultatul. rLLNA nu trebuie utilizată pentru identificarea substanțelor de testare periculoase în ceea ce privește sensibilizarea dermică în cazul în care sunt necesare informații referitoare la relația doză-efect precum, de exemplu, pentru sub-categoriile din Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor și din Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite.

DEFINIȚII

3. Definițiile utilizate sunt prevăzute în apendicele 2.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE

4. LLNA reprezintă o metodă alternativă de identificare a potențialelor substanțe chimice care produc o sensibilizare dermică. Aceasta nu implică în mod necesar că LLNA trebuie utilizată sistematic în locul testelor pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), ci mai curând că acest test este de aceeași calitate și că poate fi utilizat ca o alternativă pentru care rezultatele pozitive și negative nu mai necesită, în general, confirmări

▼M3

suplimentare. Laboratorul de testare ar trebui să țină seama de toate informațiile disponibile referitoare la substanța de test anterior derulării studiului. Astfel de informații includ identitatea și structura chimică a substanței de test, proprietățile fizico-chimice ale acesteia, rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice referitoare la substanțele chimice asociate acesteia din punct de vedere structural. Aceste informații ar trebui avute în vedere pentru a determina dacă LLNA este sau nu potrivită pentru substanța respectivă (având în vedere incompatibilitatea unor tipuri limitate de substanțe chimice cu LLNA – a se vedea punctul 5) și pentru a contribui la selectarea dozei.

5. LLNA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea activității de sensibilizare alergică prin contact. Cu toate acestea, metoda oferă posibilitatea de a reduce numărul de animale necesare în acest scop. În plus, LLNA oferă o îmbunătățire substanțială (mai puțină durere și suferință) a modului în care sunt utilizate animalele pentru testele de sensibilizare alergică prin contact. LLNA se bazează pe evaluarea evenimentelor imunologice stimulate de substanțele chimice pe parcursul etapei de inducere a sensibilizării. Spre deosebire de testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), LLNA nu impune inducerea unor reacții de hipersensibilitate dermică printr-o manifestare a declanșării. În plus, spre deosebire de testul de maximizare la cobai (13), pentru LLNA nu este necesară utilizarea unui adjuvant. Astfel, LLNA reduce durerea și suferința animalelor. În ciuda avantajelor oferite de LLNA în comparație cu B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, trebuie recunoscut faptul că există anumite limite care pot impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 (13) [de exemplu, rezultatele fals negative la LLNA pentru anumite metale, rezultatele fals pozitive pentru anumiți agenți iritanți dermici (cum ar fi anumite substanțe chimice de tipul agenților tensioactivi) (19) (20) sau solubilitatea substanței de test]. În plus, clasele sau substanțele chimice care conțin grupe funcționale demonstrate ca acționând ca potențiali factori de confuzie (21) pot impune utilizarea testelor pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13). Mai mult, analizând baza de date de validare, limitată și formată în principal din preparate pesticide, se observă că LLNA oferă mai multe rezultate pozitive pentru aceste tipuri de substanțe de test decât testele pe cobai (22). Cu toate acestea, în momentul testării preparatelor, se poate lua în calcul includerea de substanțe similare cu rezultate cunoscute ca substanțe reper pentru a demonstra că LLNA funcționează în mod corespunzător (a se vedea punctul 16). Între aceste limite identificate, LLNA poate fi aplicată pentru testarea oricăror substanțe care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea LLNA.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA este acela că agenții de sensibilizare induc proliferarea limfocitelor din ganglionii limfatici care drenează zona în care a fost aplicată substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului aplicat și constituie o metodă simplă de obținere a unei măsurători cantitative a sensibilizării. Proliferarea este măsurată comparându-se proliferarea medie la fiecare grup de test cu proliferarea medie de la grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se determină raportul dintre proliferarea medie produsă la fiecare grup tratat și cea produsă la grupul martor tratat cu vehicul, numit indice de stimulare (IS), care trebuie să aibă cel puțin valoarea 3 pentru ca substanța de test să fie clasificată ca potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise în prezenta anexă se bazează pe utilizarea marcării radioactive *in vivo* pentru măsurarea unui număr crescut de celule proliferante în ganglionii limfatici auriculari de drenare. Cu toate acestea, pot fi utilizate și alte metode de evaluare a numărului de celule proliferante, cu condiția ca cerințele referitoare SP să fie respectate integral (apendicele 1).

▼M3

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Selectarea speciilor de animale

7. Specia preferată pentru acest test este șoarecele. Se folosesc femele adulte tinere din rasa CBA/Ca sau CBA/J, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre ele trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza, de asemenea, alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA specifice rasei și/sau sexului.

Condiții de adăpostire și de hrănire

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (23), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

Pregătirea animalelor

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei, astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

Pregătirea dozelor

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora în urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării în urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

Verificarea fiabilității

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând într-un mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. Anumite autorități solicită, de asemenea, existența unei PC pentru fiecare studiu; prin urmare, utilizatorii sunt încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA. În consecință, utilizarea de rutină a unui PC concomitent este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt care este uneori impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea puncul 12). PC trebuie să prezinte un răspuns pozitiv la LLNA la un nivel

▼M3

de expunere estimat să determine o creștere a indicelui de stimulare (IS) > 3 față de grupul martor negativ (NC). Doza administrată în cazul PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (un IS > 20 ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS [Chemical Abstracts Service] 101-86-0) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v) și mercaptobenzotiazolul 5 % (nr. CAS 149-30-4) în N,N-dimetilformamida (a se vedea apendicele 1 tabelul 1). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, este posibil să fie utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.

12. În timp ce este recomandată includerea unei PC concomitente, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale ≤ 6 luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA în mod regulat (efectuează LLNA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecvente în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).

13. Un grup PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.

14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile acestor rezultate trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (12).

15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară, de asemenea, testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (24). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclus un VC separat pentru PC concomitent.

16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

— similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;

— caracteristici fizico-chimice cunoscute;

— date justificative provenind de la LLNA;

— date justificative provenind de la alte modele animale și/sau om.

▼M3

PROCEDURA DE TESTARE

Număr de animale și doză

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.

18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor din cadrul referințelor (3) și (5). Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test de interes (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (3) (25). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă pre-screening de testare (a se vedea punctele 21-24).

19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii celei mai mari concentrații posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona: ulei de măsline (4:1, v/v), N,N- dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (19), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.

20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-animale și o comparare statistică a diferențelor dintre substanța de test și măsurătorile pe grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea punctul 35). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul martor pozitiv este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (12). Mai mult, anumite autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Cu toate acestea, datele centralizate privind animalele pot fi considerate acceptabile de anumite autorități de reglementare, iar în astfel de situații utilizatorii pot opta între a colecta date individuale sau centralizate referitoare la animale.

Testarea preliminară

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.

▼M3

22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă una sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 6). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor și se punctează folosind tabelul 1 (25). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze), ziua 6. În plus, în ziua 6, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de ≥ 3 și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (26) (27). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA este doza imediat inferioară din seria de concentrații pre-screening (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

Punctaje acordate eritemelor

Observație	Punctaj
Fără eritem	0
Eritem foarte ușor (abia perceptibil)	1
Eritem bine definit	2
Eritem moderat spre grav	3
Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului	4

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (26) (27), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu cei martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cu toate acestea, în timp ce pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (30) (32) (33) (34).

24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (35) (36) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și oricare semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutății corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 6, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (37).

▼M3

Schema de tratament a studiului principal

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

— *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică 25 µL de substanță de test diluată în mod adecvat, numai sistemul vehicul sau martorul pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.

— *Zilele 2 și 3:* Se repetă procedura de aplicare efectuată în ziua 1.

— *Zilele 4 și 5:* Nu se aplică tratament.

— *Ziua 6:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal. Li se injectează 250 µL de ser fiziologic tamponat cu fosfat (PBS) conținând 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metil timidină tuturor șoarecilor de test și celor din grupul martor prin vena codală. Alternativ, tuturor șoarecilor li se injectează 250 µL de PBS steril conținând 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododeoxiuridină și 10^{-5}M fluorodeoxiuridină prin vena codală. După cinci ore, animalele sunt eutanasiate. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în PBS pentru fiecare animal (metodă individuală la nivel de animal); alternativ, se excizează ganglionii limfatici de la fiecare ureche și se păstrează împreună în PBS pentru fiecare grup experimental (metodă colectivă la nivel de grup tratat). Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi consultate în referință (12). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutății eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).

Prepararea suspensiilor celulare

26. Se prepară o singură suspensie celulară conținând celule din ganglioni limfatici (LNC) excizate bilateral prin metoda individuală la nivel de animal sau alternativ prin metoda colectivă la nivel de grup tratat, printr-o separare mecanică ușoară realizată cu ajutorul unei site din oțel inoxidabil cu ochiuri de 200 µm sau o altă tehnică acceptabilă de generare a unei singure suspensii celulare. LNC se spală de două ori cu PBS în exces, iar ADN-ul se precipită cu o soluție de acid tricloracetic (TCA) de 5 % la 4 °C timp de 18h (3). Granulele se suspendă din nou în 1 mL de soluție de acid tricloracetic și se transferă în flacoane de scintilație conținând 10 mL de fluid de scintilație pentru determinarea tritiului ^{3}H sau se transferă direct în tuburile cu raze gama pentru determinarea iodului ^{125}I.

Determinarea proliferării celulare (radioactivitate încorporată)

27. Încorporarea de ^{3}H-metil timidină se măsoară prin determinarea β-scintilației, în dezintegrări pe minut (DPM). Încorporarea de ^{125}I-iododeoxiuridină se măsoară prin determinarea iodului ^{125}I și se exprimă, de asemenea, în DPM. În funcție de metoda utilizată, încorporarea se exprimă ca DPM/șoarece (metoda individuală la nivel de animal) sau DPM/grup tratat (metoda colectivă la nivel de grup).

LLNA simplificată

28. În anumite situații, atunci când există o necesitate de reglementare pentru a confirma o estimare negativă referitoare la potențialul de sensibilizare dermică, poate fi utilizat un protocol opțional rLLNA (16) (17) (18) cu mai puține animale, cu condiția să se respecte toate celelalte specificații de protocol LLNA din această metodă de testare. Înainte de aplicarea metodei rLLNA, trebuie furnizate justificări clare și științifice pentru utilizarea acesteia. În cazul în care se obțin rezultate pozitive sau echivoce, ar putea fi necesare teste adiționale pentru a interpreta sau clarifica rezultatele.

▼M3

29. Reducerea numerică a grupurilor testate reprezintă singura diferență dintre protocoalele metodelor de testare LLNA și rLLNA, iar din acest motiv rLLNA nu furnizează informații referitoare la relația doză-răspuns. Prin urmare, rLLNA nu trebuie utilizată dacă sunt necesare informații referitoare la relația doză-răspuns. Ca și în cazul dozelor multiple LLNA, concentrația substanței de test evaluată în cadrul rLLNA trebuie să fie concentrația maximă care nu induce toxicitate sistemică evidentă și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece (a se vedea punctul 18).

OBSERVAȚII

Observații clinice

30. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricăror semne clinice, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau coroziunea pielii, în vederea eutanasierii (37).

Greutatea corporală

31. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

CALCULAREA REZULTATELOR

32. Rezultatele pentru fiecare grup testat se exprimă printr-un indice de stimulare (IS). Dacă se folosește metoda individuală la nivel de animal, IS se determină prin împărțirea valorii medii a DPM/șoarece din fiecare grup tratat cu substanța de test și a valorii medii pentru grupul martor pozitiv la valoarea medie a DPM/șoarece din grupul martor tratat cu solvent/vehicul. IS mediu pentru grupul martor tratat cu vehicul are valoarea 1. Dacă se folosește metoda colectivă la nivel de grup, IS se obține prin împărțirea încorporării radioactive colective înregistrate de fiecare grup tratat la încorporarea înregistrată de grupul martor tratat cu vehicul; astfel se calculează un IS mediu.

33. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când IS $\geq$ 3. Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită ca fiind pozitiv (4)(5)(6).

34. Dacă rezultatele obținute nu sunt suficient de concludente, trebuie examinate diferitele proprietăți ale substanței de test, inclusiv dacă prezintă o relație structurală cu agenți cunoscuți de sensibilizare dermică și dacă provoacă iritații cutanate excesive la șoareci, precum și relația doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt discutate în detaliu în alt document (7).

35. Colectarea datelor de radioactivitate pentru fiecare animal permite analiza statistică a prezenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparări ale grupurilor testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparări pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul variațelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite câteodată „valori aberante”).

▼M3

DATE ȘI RAPORTARE

Date

36. Datele se sistematizează în tabele. În cazul în care se utilizează metoda individuală la nivel de animal, se precizează valorile DPM pentru fiecare animal, media DPM/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard a mediei) și IS mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul. Dacă se utilizează metoda colectivă la nivel de grup, se indică media/mediana DPM și IS mediu pentru fiecare grup tratat comparativ cu grupul VC concomitent.

Raportul de testare

37. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța de test și substanța martor:

— date de identificare (de exemplu, numerele CAS și CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);

— starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);

— în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

— date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);

— justificarea alegerii vehiculului;

Animalele de experiență:

— proveniența șoarecilor de rasa CBA;

— statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

— detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;

— justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);

— concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);

— detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;

— metodele de măsurare a toxicității;

— criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;

— detalii privind abaterile de protocol și explicații referitoare la modul în care acestea afectează abaterea de la conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

— un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;

— date concomitente și/sau istorice privind martorii pozitivi și negativi, utilizate de laboratorul de testare;

▼M3

— în cazul în care nu a fost inclus un martor pozitiv (PC) concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent martor pozitiv periodic și un raport detaliind datele istorice privind martorii pozitivi specifice laboratorului astfel încât să se justifice de ce nu a fost pus în aplicare niciun martor pozitiv concomitent;

Rezultate:

— greutatea fiecărui șoarece la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și intervalul de eroare asociat (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;

— momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;

— tabloul valorilor individuale (metoda individuală) sau medii/mediane (metoda colectivă la nivel de grup tratat) exprimate ca DPM (dezintegrare pe minut), precum și valorile IS pentru fiecare grup tratat;

— media și marja de eroare asociată (de exemplu deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a DPM/animal pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante pentru fiecare grup tratat, dacă se utilizează metoda individuală la nivel de animal;

— indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în cadrul grupurilor tratate cu substanța de test, cât și în cadrul grupurilor martor, dacă se utilizează metoda individuală la nivel de animal;

— relația doză-răspuns;

— analize statistice, dacă este cazul;

Discutarea rezultatelor:

— un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, precum și o concluzie care să indice dacă substanța de testat trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Disponibil la: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Disponibil la: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Apendicele 1

Standarde de performanță pentru evaluarea metodelor de testare LLNA similare sau modificate propuse pentru sensibilizarea dermică

INTRODUCERE

1. Scopul standardelor de performanță (SP) este de a indica temeiul de evaluare a acurateții și fiabilității noilor metode de testare, protejate sau nu (de exemplu, cu drept de autor, marcă depusă sau înregistrare), în raport cu obiectivele definite. Standardele de performanță, bazate pe metode de testare validate și acceptate, pot fi utilizate pentru a evalua fiabilitatea și acuratețea altor metode similare (cunoscute în limbaj curent sub denumirea de teste „me-too") bazate pe principii științifice similare și care măsoară sau estimează același efect biologic sau toxic (14).

2. Înainte de a adopta metode modificate (și anume, potențiale îmbunătățiri propuse pentru o metodă de testare aprobată), trebuie efectuată o evaluare în vederea stabilirii efectului modificărilor propuse asupra performanței testului și măsura în care astfel de modificări afectează informațiile disponibile pentru celelalte elemente componente ale procesului de validare. În funcție de numărul și de natura modificărilor propuse, datele generate și documentația corespunzătoare pentru modificările respective, procesul de validare este același ca și în cazul unui nou test sau, dacă este cazul, acesta este limitat la o evaluare a fiabilității și relevanței pe baza SP stabilite (14).

3. Fiabilitatea și acuratețea metodelor similare sau modificate propuse pentru utilizare în cadrul prezentei MT se evaluează cu ajutorul unor substanțe chimice reprezentând întreaga serie de rezultate ale LLNA. Pentru a evita utilizarea nejustificată a animalelor, se recomandă cu fermitate ca dezvoltatorii de modele să se consulte cu autoritățile corespunzătoare înainte de a demara studiile de validare în conformitate cu SP și cu orientarea furnizată în prezenta MT.

4. Standardele de performanță se bazează pe standardele armonizate ale Comitetului de coordonare inter-agenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA, ale Centrului European pentru validarea metodelor alternative (CE-ECVAM) al Comisiei Europene și ale Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (12), pentru evaluarea validității versiunilor similare sau modificate ale LLNA. Standardele de performanță conțin elementele esențiale ale metodei de testare, substanțele chimice de referință recomandate și standardele de acuratețe și fiabilitate pe care metoda propusă ar trebui să le respecte sau să le depășească.

I. **Elemente esențiale ale metodei de testare**

5. În vederea garantării faptului că o metodă LLNA similară sau modificată este similară din punct de vedere funcțional și structural cu metoda LLNA și că măsoară același efect biologic, în protocolul metodei de testare trebuie incluse următoarele elemente:

— substanța de test trebuie aplicată local pe ambele urechi ale șoarecelui;

— proliferarea limfocitelor se măsoară în ganglionii limfatici de drenare de la locul aplicării substanței de test;

— proliferarea limfocitelor trebuie măsurată în cursul etapei de inducție a sensibilizării dermice;

▼M3

— în ceea ce privește substanțele de test, cea mai mare doză selectată trebuie să corespundă concentrației maxime care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece. Pentru substanțele de referință pozitive, doza maximă trebuie să fie mai mare sau egală cu valorile CE3 ale LLNA pentru substanțele chimice de referință corespunzătoare (a se vedea tabelul 1), fără a induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă la șoarece;

— fiecare studiu include un vehicul martor concomitent și, dacă este cazul, utilizează, de asemenea, un martor pozitiv concomitent;

— grupul tratat trebuie să fie format din cel puțin patru animale;

— pot fi colectate fie date individuale, fie date colective privind animalele.

În cazul nerespectării unuia dintre aceste criterii, aceste standarde de performanță nu permit validarea metodei de testare similare sau modificate.

II. **Lista minimală a substanțelor chimice de referință**

6. În cadrul standardelor de performanță armonizate ale Comitetului de coordonare inter-agenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA, ale Centrului European pentru validarea metodelor alternative (CE-ECVAM) al Comisiei Europene și ale Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (12), se regăsește un minimum de 18 substanțe chimice care trebuie utilizate și patru substanțe chimice de referință opționale. Aceste patru substanțe produc fie rezultate fals pozitive, fie fals negative în cadrul LLNA, ceea ce nu se întâmplă în cazul rezultatelor testelor pe om sau pe cobai (B.6 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13) și care permit, prin urmare, demonstrarea unei performanțe mai mari sau egale cu cea a LLNA. Criteriile de selecție pentru identificarea acestor substanțe sunt următoarele:

— lista substanțelor de referință include tipurile de substanțe testate în mod obișnuit pentru potențialul de sensibilizare dermică, precum și gama de răspunsuri pe care LLNA le poate măsura și estima;

— substanțele prezintă structuri chimice bine definite;

— sunt puse la dispoziție, pentru fiecare substanță, date LLNA provenite de la teste pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13) și (unde a fost posibil) date provenite de la testele efectuate pe om; și

— substanțele sunt disponibile în comerț.

Substanțele de referință recomandate sunt menționate în tabelul 1. Studiile care utilizează substanțele de referință propuse trebuie evaluate împreună cu vehiculul corespunzător indicat în tabelul 1. În situațiile în care o substanță enumerată nu este disponibilă, pot fi utilizate alte substanțe care îndeplinesc criteriile de selecție menționate, cu o justificare corespunzătoare.

▼M3

Tabelul 1

Substanțe de referință recomandate pentru standardele de performanță LLNA

Număr	Substanțe chimice ([1])	Nr. CAS	Formă	Veh ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x CE3	Intervalul actual CE3	LLNA vs. teste pe cobai	LLNA vs. teste pe om
1	5-Cloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onă (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-onă (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Lichid	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Solid	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiamină	106-50-3	Solid	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Clorură de cobalt	7646-79-9	Solid	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Lichid	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Lichid	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Lichid	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Lichid	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoat de fenil	93-99-2	Solid	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcool cinamic	104-54-1	Solid	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil uree	39236-46-9	Solid	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilat de metil	80-62-6	Lichid	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorbenzen	108-90-7	Lichid	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Izopropanol	67-63-0	Lichid	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Număr	Substanțe chimice ([1])	Nr. CAS	Formă	Veh ([2])	CE3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x CE3	Intervalul actual CE3	LLNA vs. teste pe cobai	LLNA vs. teste pe om
16	Acid lactic	50-21-5	Lichid	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilat de metil	119-36-8	Lichid	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Acid salicilic	69-72-7	Solid	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Substanțe opționale pentru demonstrarea performanței îmbunătățite în raport cu LLNA										
19	Lauril sulfat de sodiu	151-21-3	Solid	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilenglicol dimetacrilat	97-90-5	Lichid	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xilen	1330-20-7	Lichid	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Clorură de nichel	7718-54-9	Solid	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abrevieri: AOO = acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v); nr. CAS = numărul de registru al *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N,N*-dimetilformamidă; DMSO = sulfoxid de dimetil; DNCB = dinitro-2,4-clorbenzen; EC3 = concentrația estimată necesară pentru a produce un indice de stimulare egal cu 3; GP = rezultatul testului pe cobai (și anume B. 6 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13); HCA = hexilcinamaldehidă; LLNA = Rezultatul testului pe ganglioni limfatici locali murini (și anume B.42 sau orientarea OCDE privind testarea nr. 429) (1); MEK = metil etil cetonă; NA = nu se aplică deoarece indicele de stimulare < 3; NC = nu este calculat, deoarece datele au fost obținute dintr-un singur studiu; Veh = vehicul de test.

(*) Presupus a fi un agent de non-sensibilizare la om având în vedere că nu au fost localizate rezultate ale testului clinic epicutanat, nu este inclus ca alergen în setul testului epicutanat și nu au fost localizate cazuri raportate de sensibilizare la om.

(**)nu sunt disponibile date de la teste pe cobai.

([1]) Substanțele chimice trebuie preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează acceptabilitatea stocării acestora.

([2]) Ca urmare a impactului potențial al diferitelor vehicule asupra performanței LLNA, trebuie utilizat vehiculul recomandat pentru fiecare substanță de referință (24) (32).

([3]) Valoarea medie, acolo unde au fost disponibile mai multe valori EC3. Pentru substanțele negative (cu indice de stimulare < 3), este furnizată cea mai mare concentrație testată.

([4]) Numărul de studii LLNA în urma cărora au fost obținute datele.

([5]) Disponibil sub formă comercială ca Kathon CG (nr. CAS 55965-84-9), care reprezintă un amestec de CMI și MI 3:1. Concentrațiile relative pentru fiecare componentă se situează între 1,1 % și 1,25 % (CMI), respectiv 0,3 % și 0,45 % (MI). Componentele inactive sunt săruri de magneziu (21,5 %-24 %) și nitrat de cupru (0,15 %-0,17 %), restul preparatului fiind apă 74 %-77 %. Kathon CG este ușor accesibil prin intermediul Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (în prezent *Dow Chemical Corporation*).

▼M3

III. **Standarde de fiabilitate și de acuratețe**

7. Precizia unei metode LLNA similare sau modificate trebuie să îndeplinească sau să depășească acuratețea standardelor de performanță LLNA în cadrul unei evaluări efectuate cu ajutorul celor 18 substanțe chimice de referință minimale care trebuie utilizate. Metoda nouă sau modificată trebuie să rezulte într-o clasificare corectă a substanțelor ca fiind pozitive sau negative pe baza unei decizii de tip „da/nu”. Cu toate acestea, metoda nouă sau modificată ar putea să nu clasifice corect toate substanțele de referință minime care trebuie utilizate. Dacă, spre exemplu, unul dintre agenții slabi de sensibilizare este incorect clasificat, testul poate fi considerat ca prezentând o performanță echivalentă, cu condiția furnizării unei justificări a clasificării eronate, precum și a unor date adiționale adecvate (de exemplu, rezultate ale testelor care furnizează clasificări corecte pentru alte substanțe cu proprietăți fizice, chimice și de sensibilizare similare cu cele ale substanței chimice de referință clasificate incorect). În astfel de circumstanțe, situația validării metodei de testare LLNA noi sau modificate trebuie evaluată pentru fiecare caz în parte.

Reproductibilitatea intra-laborator

8. Reproductibilitatea intra-laborator a unei metode LLNA noi sau modificate se determină cu ajutorul unei substanțe de sensibilizare caracterizată clar în cadrul LLNA. Prin urmare, SP LLNA se bazează pe variabilitatea rezultatelor testelor repetate cu hexilcinamaldehidă (HCA). Fiabilitatea intra-laborator se evaluează prin compararea valorilor minime ale concentrației estimate (CEm) obținute cu HCA în cadrul a patru teste repetate la interval de cel puțin o săptămână. Reproductibilitatea intra-laborator este considerată acceptabilă atunci când un laborator reușește să obțină valori ale CEm cuprinse între 5 % și 20 %, pentru fiecare test cu HCA, ceea ce corespunde unei valori de 0,5-2,0 ori media CE3 prevăzută pentru HCA (10 %) în cadrul LLNA (a se vedea tabelul 1).

Reproductibilitatea inter-laborator

9. Reproductibilitatea inter-laborator a unei metode LLNA noi sau modificate se determină cu ajutorul a două substanțe de sensibilizare care sunt clar caracterizate în cadrul LLNA. SP LLNA se bazează pe variabilitatea rezultatelor testelor efectuate cu HCA și dinitro-2,4-clorbenzen (DNCB) în laboratoare diferite. Valorile CEm trebuie obținute în studii independente efectuate în cel puțin trei laboratoare separate. Reproductibilitatea inter-laborator este considerată acceptabilă atunci când fiecare laborator obține valori ale CEm cuprinse între 5 % și 20 % pentru fiecare test cu HCA și între 0,025 % și 0,1 % pentru DNCB, ceea ce corespunde unei valori de 0,5-2,0 ori media CE3 prevăzută pentru HCA (10 %) și, respectiv, pentru DNCB (0,05 %) în cadrul LLNA (a se vedea tabelul 1).

▼**M3**

Apendicele 2

Definiții

Acurateţe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare şi valorile de referinţă acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanţă ale metodei de testare şi unul dintre aspectele relevanţei acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanţă”, pentru a desemna proporţia de rezultate corecte ale unei metode de testare (14).

Substanţă etalon: O substanţă de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparaţia cu o substanţă de test. O substanţă etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăţi: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) şi sigură (sigure); (ii) asemănări structurale şi funcţionale cu clasa de substanţe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efectele cunoscute; şi (v) influenţă cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Concentraţie estimată minimă (CEm): Concentraţia estimată a unei substanţe de test necesară pentru a produce un indice de stimulare care indică un răspuns pozitiv.

Concentraţie estimată trei (CE3): Concentraţia estimată a unei substanţe de test necesară pentru a produce un indice de stimulare cu valoarea trei.

Fals negativ: O substanţă de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, ea fiind de fapt pozitivă sau activă.

Fals pozitiv: O substanţă de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, aceasta fiind de fapt negativă sau inactivă.

Pericol: Potenţialul de efect negativ asupra mediului sau sănătăţii. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

Reproductibilitate inter-laborator: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând acelaşi protocol şi testând aceleaşi substanţe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ şi cantitativ. Reproductibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de pre-validare şi de validare şi indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită, de asemenea, reproductibilitatea între laboratoare (14).

Reproductibilitate intra-laborator: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiaşi laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (14).

Test „me-too”: O expresie colocvială utilizată pentru a denumi o metodă de testare care, din punct de vedere structural şi funcţional, este similară cu o metodă de testare de referinţă validată şi acceptată. O astfel de metodă de testare ar putea face obiectul unei validări accelerate. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară (14).

Valoare aberantă: O valoare aberantă este o observaţie considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eşantion aleatoriu dintr-o populaţie.

Standarde de performanţă (SP): Standarde, bazate pe o metodă de testare validată, care furnizează baza pentru evaluarea comparabilităţii unei metode de testare propuse, similară din punct de vedere funcţional şi mecanic. Sunt incluse: (i) componente esenţiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimă a substanţelor de referinţă selectate dintre substanţele utilizate pentru a demonstra performanţa acceptabilă a metodei de testare validate; şi (iii) niveluri similare de acurateţe şi fiabilitate, bazate pe datele obţinute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă trebuie să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanţe de referinţă (14).

Metodă de testare protejată: O metodă de testare a cărei producere şi distribuire sunt restricţionate de brevete, drepturi de autor, mărci etc.

▼**M3**

Asigurarea calității: Un proces de gestionare prin care aderarea la standardele și cerințele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor și acuratețea transferului de date sunt evaluate de persoane independente de cele care au efectuat testarea.

Substanțe de referință: Substanțe chimice selectate pentru utilizare în procesul de validare, pentru care răspunsurile la sistemul de testare de referință *in vitro* sau *in vivo* sau speciile studiate sunt deja cunoscute. Substanțele respective trebuie să fie reprezentative pentru clasele de substanțe chimice pentru care este preconizată utilizarea metodei de testare și trebuie să reprezinte toată gama de răspunsuri care pot fi preconizate de la substanțele pentru care ar putea fi folosite, de la puternic, la slab, la negativ. Ar putea fi necesare diferite seturi de substanțe chimice de referință pentru diferitele etape ale procesului de validare și pentru diferite metode de testare și diferite utilizări ale testului (14).

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul studiat și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Ea reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateții (conformității) unei metode de testare (14).

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (14).

Sensibilizare dermică: Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun ce poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

Indice de stimulare (IS): O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test care reprezintă raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate și cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

Substanță de test (denumită, de asemenea, substanță chimică de test): Orice substanță sau amestec testat prin utilizarea prezentei metode de testare.

Metodă de testare validată: Metodă de testare în legătură cu care studiile de validare au fost încheiate în scopul determinării relevanței (inclusiv acuratețea) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al acurateții și fiabilității, încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (14).

▼B

B.43. **STUDII DE NEUROTOXICITATE PE ROZĂTOARE**

1. **METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 424 (1997) a OCDE.

Această metodă de testare a fost elaborată în vederea obținerii informațiilor necesare pentru a confirma sau pentru a caracteriza mai eficient potențiala neurotoxicitate a unei substanțe la animale adulte. Poate fi utilizată împreună cu alte metode de testare în cadrul studiilor de toxicitate cu doză repetată sau în cadrul unui studiu separat. Se recomandă consultarea Liniilor directoare OCDE privind strategiile și metodele de testare a neurotoxicității (1) pentru elaborarea studiilor bazate pe această metodă de testare. Acest lucru este deosebit de important dacă se anticipează modificarea observațiilor și a procedurilor de testare recomandate în mod obișnuit pentru această metodă. Liniile directoare au fost elaborate pentru facilita alegerea altor proceduri de testare care urmează să fie utilizate în împrejurări speciale.

Această metodă nu este destinată evaluării neurotoxicității asupra dezvoltării.

1.1. INTRODUCERE

Pentru evaluarea caracteristicilor toxice ale produselor chimice trebuie avute în vedere posibilele efecte neurotoxice. Metoda de testare a toxicității sistemice cu doză repetată permite o primă triere a substanțelor care ar putea fi neurotoxice. Această metodă de testare poate fi utilizată pentru elaborarea unui studiu destinat obținerii de informații suplimentare privind efectele neurotoxice observate în cadrul studiilor de toxicitate sistemică cu doză repetată sau confirmării acestora. Cu toate acestea, în unele cazuri, potențiala neurotoxicitate a anumitor categorii de substanțe chimice poate fi evaluată în mod mai adecvat direct prin aplicarea acestei metode, fără colectarea în prealabil a indicațiilor care pot fi oferite de studiile de toxicitate sistemică cu doză repetată. Aici sunt incluse, de exemplu, cazurile în care:

— sunt observate semne de neurotoxicitate sau leziuni neuropatologice în cadrul studiilor de toxicitate, altele decât studiile de toxicitate sistemică cu doză repetată; sau

— substanțele prezintă asemănări de structură sau există alte informații privind existența unor caracteristici comune cu substanțe neurotoxice cunoscute.

În plus, utilizarea acestei metode poate fi adecvată și în alte cazuri; pentru mai multe informații a se vedea referința 1.

Această metodă a fost elaborată astfel încât să poată fi adaptată în funcție de diverse nevoi specifice privind confirmarea neurotoxicității histopatologice și comportamentale a unei substanțe chimice, precum și pentru a oferi o caracterizare și o cuantificare a reacției neurotoxice.

▼B

În trecut, neurotoxicitatea era asimilată unei neuropatii implicând leziuni neuropatologice sau disfuncții neurologice, cum ar fi convulsiile, paralizia sau tremorul. Deși neuropatia reprezintă o manifestare importantă a neurotoxicității, în prezent este evident că mai există multe alte semne de toxicitate la nivelul sistemului nervos (de exemplu pierderea coordonării motorii, deficiențe senzoriale, diminuarea capacității de învățare și a memoriei) care nu sunt întotdeauna evidențiate de studiile asupra neuropatiei sau de alte tipuri de studii.

Această metodă de testare a neurotoxicității a fost elaborată în vederea detectării efectelor neurocomportamentale și neuropatologice importante la rozătoare adulte. Deși efectele la nivelul comportamentului pot indica un impact negativ asupra organismului chiar și în absența unor modificări morfologice, nu toate modificările la nivelul comportamentului sunt specifice sistemului nervos. În consecință, toate modificările observate trebuie evaluate având în vedere și datele histopatologice, hematologice sau biochimice corespondente, precum și datele privind alte tipuri de toxicitate sistemică. Testele care trebuie realizate în cadrul acestei metode pentru caracterizarea și cuantificarea reacțiilor neurotoxice cuprind proceduri histopatologice și comportamentale specifice care pot fi completate prin investigații electrofiziologice și/sau biochimice (1) (2) (3) (4).

Substanțele neurotoxice pot acționa asupra mai multor ținte din cadrul sistemului nervos prin mai multe mecanisme. Deoarece nu se poate elabora o singură serie de teste care să permită o evaluare aprofundată a potențialului neurotoxic al tuturor substanțelor, poate fi necesară și efectuarea altor teste *in vivo* sau *in vitro* specifice tipurilor de neurotoxicitate studiate sau preconizate.

Această metodă de testare poate fi utilizată, de asemenea, împreună cu indicațiile prevăzute în Liniile directoare OCDE privind strategiile și metodele de testare a neurotoxicității (1) în vederea elaborării de studii destinate unei mai bune caracterizări și cuantificări a relației doză-efect pentru o mai bună estimare a nivelului concentrației la care nu se observă niciun efect advers sau pentru a pune în evidență pericolele cunoscute sau potențiale prezentate de substanța respectivă. De exemplu, pot fi elaborate studii destinate identificării și evaluării mecanismului sau mecanismelor neurotoxice sau completării datelor deja obținute prin protocoalele de observație neurocomportamentale și neuropatologice de bază. Prin aceste studii nu trebuie să se încerce obținerea acelorași date care ar fi obținute oricum prin utilizarea protocoalelor standard recomandate pentru această metodă dacă datele respective sunt deja disponibile și nu sunt considerate necesare pentru interpretarea rezultatelor studiului.

Informațiile oferite de acest test de neurotoxicitate, efectuat independent sau în combinație cu alte teste, permit:

— determinarea caracterului permanent sau reversibil al efectelor substanței chimice asupra sistemului nervos;

— o mai bună caracterizare a alterărilor de la nivelul sistemului nervos asociate expunerii la substanța chimică și o mai bună înțelegere a mecanismelor care stau la baza acestora;

▼B

— determinarea relației doză-efect și timp-efect în vederea estimării nivelului concentrației la care nu se observă niciun efect advers (care se poate utiliza pentru stabilirea criteriilor de siguranță pentru substanța chimică respectivă).

În cadrul acestei metode de testare, substanța de testat se administrează pe cale orală. Dacă sunt mai adecvate alte căi de administrare (de exemplu dermică sau prin inhalare), este posibil să se impună și modificarea procedurilor recomandate. Alegerea căii de administrare depinde de tipul expunerii la om și de informațiile toxicologice și cinetice disponibile.

1.2. DEFINIȚII

Efect advers: orice alterare față de nivelul de referință provocată de tratament și care reduce capacitatea de supraviețuire, de reproducere sau de adaptare la mediu a organismului.

Doză: cantitatea de substanță de testat administrată. Doza se exprimă ca greutate (g, mg) a substanței de testat sau ca greutate a substanței de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență (de exemplu mg/kg) sau sub formă de concentrație alimentară constantă (ppm).

Dozare: termen general care desemnează doza administrată, frecvența și durata administrării.

Neurotoxicitate: modificare adversă a structurii sau a funcției sistemului nervos provocată de expunerea la un agent chimic, biologic sau fizic.

Substanță neurotoxică: orice agent chimic, biologic sau fizic care poate provoca neurotoxicitate.

NOAEL: abrevierea pentru nivelul dozei fără efect advers vizibil; reprezintă nivelul cel mai mare al dozei la care nu se observă niciun efect advers provocat de tratament.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testat se administrează pe cale orală sub forma mai multor doze mai multor grupuri de rozătoare de experiență. În general, se administrează doze repetate, în cadrul unui regim de dozare de 28 de zile, subcronic (90 de zile) sau cronic (1 an sau mai mult). Procedura descrisă în cadrul acestei metode poate fi utilizată și pentru studiile de neurotoxicitate acută. Animalele sunt testate în vederea detectării sau a caracterizării anomaliilor comportamentale și/sau neurologice. Pe parcursul fiecărei perioade de observație se evaluează diferite aspecte ale comportamentului care pot fi afectate de substanțe neurotoxice. La sfârșitul testului se perfuzează *in situ* animale de fiecare sex din fiecare grup și li se recoltează în vederea preparării și a examinării secțiuni din creier, din măduva spinării și din nervii periferici.

Dacă studiul se realizează independent în vederea depistării neurotoxicității sau a caracterizării efectelor neurotoxice, animalele din fiecare grup care nu sunt utilizate pentru perfuzare și pentru examenul histopatologic ulterior (a se vedea tabelul 1) pot fi utilizate pentru diferite proceduri neurocomportamentale, neurochimice sau electrofiziologice pe baza cărora se pot completa datele colectate în cadrul examinărilor standard impuse de această metodă (1). Aceste examinări suplimentare pot fi deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice sau efectele anticipate sugerează un tip specific de neurotoxicitate sau o țintă a neurotoxicității substanței. Restul animalelor pot fi, de asemenea, utilizate pentru evaluări de tipul celor din cadrul metodelor de testare din studiile de toxicitate cu doză repetată pe rozătoare.

▼B

Dacă procedurile din cadrul acestei metode sunt combinate cu cele din cadrul altor metode, trebuie să se prevadă un număr de animale suficient pentru realizarea observațiilor impuse de ambele studii.

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Alegerea speciei de animale**

Specia preferată de rozătoare este șobolanul, deși se pot utiliza și alte specii, dacă se justifică alegerea. Se folosesc rase de experiență, alegându-se animale adulte tinere și sănătoase. Femelele trebuie să fie nulipare și să nu fie însărcinate. Administrarea dozelor trebuie să înceapă cât mai curând posibil după înțărcare, preferabil înainte ca animalele să împlinească vârsta de șase săptămâni și în orice caz înainte de atingerea vârstei de nouă săptămâni. Cu toate acestea, dacă acest studiu se realizează în combinație cu altele, este posibil să fie necesară ajustarea acestei limite de vârstă. La începutul studiului diferențele de greutate dintre animalele utilizate nu trebuie să depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex. Dacă se realizează un studiu de scurtă durată cu doză repetată ca test preliminar pentru un studiu pe termen lung, în ambele studii se folosesc animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

1.4.2. **Condiții de adăpostire și de hrănire**

Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul pentru umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, și se alternează 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric. Sunetele puternice intermitente trebuie reduse la minimum. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de faptul că în acesta trebuie adăugată și substanța de testat, dacă se administrează prin această metodă. Animalele pot fi găzduite în cuști fie individual, fie în grupuri mici de același sex.

1.4.3. **Pregătirea animalelor**

Se aleg aleatoriu animal tinere și sănătoase care se împart în grupul tratat și în grupul martor. Cuștile trebuie aranjate astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte provocate de această aranjare. Animalele se marchează individual astfel încât să poată fi identificate și se păstrează în cuști timp de cel puțin 5 (cinci) zile înainte de începerea studiului pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator.

1.4.4. **Calea de administrare și pregătirea dozelor**

În cadrul acestei metode substanța de testat se administrează pe cale orală. Substanța de testat se poate administra prin gavaj, prin alimentație, prin apa potabilă sau prin capsule. Se pot utiliza și alte căi de administrare (de exemplu dermică sau prin inhalare), dar este posibil să fie necesară modificarea procedurilor recomandate. Alegerea căii de administrare depinde de tipul expunerii la om și de informații toxicologice și cinetice disponibile. Alegerea căii de administrare precum și eventualele modificări aduse procedurilor din cadrul acestei metode de testare trebuie justificate.

▼B

Dacă este necesar, substanța de testat se poate dizolva sau suspenda într-un vehicul adecvat. Se recomandă utilizarea de soluții sau suspensii apoase, și numai dacă acest lucru nu este posibil, utilizarea de soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) sau, ca soluție de ultimă instanță, utilizarea de soluții/suspensii în care se folosesc alte vehicule. Proprietățile toxice ale vehiculului trebuie să fie cunoscute. În plus, trebuie avute în vedere și următoarele caracteristici ale vehiculului: efectele acestuia asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau retenției substanței de testat care i-ar putea afecta caracteristicile toxice și efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalului.

1.5. PROCEDURA DE TESTARE

1.5.1. **Numărul și sexul animalelor**

Dacă studiul se realizează independent, se folosesc cel puțin 20 de animale (10 femele și 10 masculi) pentru fiecare grup tratat sau grup martor pe care se vor realiza observații clinice și funcționale. La sfârșitul studiului, dintre cei zece masculi și cele zece femele se selectează cel puțin cinci masculi și cinci femele care sunt perfuzați *in situ* și supuși unui examen neuro-histopatologic detaliat. Dacă se observă doar un număr limitat de animale dintr-un grup tratat în vederea detectării efectelor neurotoxice, animalele în cauză trebuie să fie printre cele perfuzate. Dacă studiul se realizează împreună cu un studiu de toxicitate cu doză repetată, se folosește un număr adecvat de animale care permite îndeplinirea obiectivelor ambelor studii. În tabelul 1 este indicat numărul minim de animale din fiecare grup necesar pentru diferite combinații de studii. Dacă este prevăzută sacrificarea unor animale înainte de finalizarea studiului sau constituirea unor grupuri pe care să se observe reversibilitatea efectelor, persistența sau survenirea efectelor toxice cu întârziere după tratare, sau dacă se preconizează realizarea unor observații suplimentare, numărul de animale trebuie majorat astfel încât să fie suficient pentru efectuarea observațiilor și a examenelor histopatologice.

1.5.2. **Grupul tratat și grupul martor**

Ca regulă generală, trebuie să existe cel puțin trei grupuri tratate, dar dacă din evaluarea altor date disponibile rezultă că administrarea repetată a unei doze de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi nu are niciun efect, se poate realiza un test-limită. Dacă nu sunt disponibile date adecvate, se poate realiza un studiu preliminar destinat stabilirii nivelurilor dozelor care trebuie utilizate. Exceptând tratamentul cu substanța de testat, animalele din grupul martor se tratează în mod identic cu animalele din grupul tratat. Dacă substanța de testat se administrează cu ajutorul unui vehicul, grupul martor trebuie să primească, de asemenea, un volum de vehicul egal cu cel mai mare volum utilizat pentru grupul tratat.

1.5.3. **Verificarea fiabilității**

Laboratorul care realizează studiul trebuie să prezinte date care demonstrează capacitatea sa de a realiza studiul și sensibilitatea metodelor utilizate. Aceste date trebuie să dovedească posibilitatea de detectare și cuantificare, după caz, a diferitelor criterii recomandate, de exemplu reacții neurovegetative, reactivitate senzorială, forță de prehensiune și activitate motorie. Referințele 2-9 conțin informații privind substanțele care provoacă diferite tipuri de reacții neurotoxice și care pot fi utilizate ca substanțe martor pozitiv. Se pot utiliza și date istorice, cu condiția ca elementele principale ale procedurilor de testare să rămână aceleași. Se recomandă actualizarea periodică a datelor istorice. De fiecare dată când laboratorul modifică un element esențial al testelor sau al metodelor trebuie să se obțină date noi care să demonstreze că sensibilitatea procedurii se menține.

▼B

1.5.4. **Alegerea dozei**

Nivelurile dozelor trebuie alese având în vedere toate datele disponibile privind toxicitatea și cinetica substanței de testat sau ale substanțele înrudite. Se alege cea mai mare doză pentru a provoca efecte neurotoxice sau efecte de toxicitate sistemică evidente. În continuare se alege o serie de doze descrescătoare pentru a se pune în evidență o eventuală relație doză-efect și absența nivelului dozei fără efect advers vizibil (NOAEL) la cel mai mic nivel al dozei. În principiu nivelurile dozelor trebuie alese astfel încât efectele neurotoxice primare de la nivelul sistemului nervos să poată fi deosebite de efectele legate de toxicitatea sistemică. Cea mai bună soluție constă de multe ori din alegerea a două sau trei intervale, iar adăugarea unui al patrulea interval este adesea preferabilă utilizării unor intervale foarte mari (de exemplu care depășesc factorul 10) între dozaje. Dacă există estimări realiste privind expunerea umană, acestea trebuie, de asemenea, luate în considerare.

1.5.5. **Testul-limită**

Dacă un studiu cu o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi realizat în conformitate cu metoda descrisă anterior nu provoacă niciun efect neurotoxic observabil și dacă datele privind compușii cu structură asemănătoare sugerează că este puțin probabil ca substanța să fie toxică, se poate considera că nu este necesară realizarea unui studiu cu trei niveluri de dozare. În funcție de expunerea umană anticipată, este posibil să fie necesară mărirea dozei orale administrate în cadrul testului-limită. Pentru celelalte căi de administrare, cum sunt inhalarea și aplicarea dermică, nivelul maxim posibil de expunere este adesea determinat de proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat. Pentru studiile orale acute, doza din cadrul testului-limită trebuie să fie de cel puțin 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administrarea dozelor**

Animalelor li se administrează substanța de testat în fiecare zi, șapte zile pe săptămână, timp de cel puțin 28 de zile; administrarea timp de cinci zile pe săptămână sau alegerea unei perioade mai scurte de expunere trebuie justificate. Dacă substanța de testat se administrează prin gavaj, animalele trebuie să primească o doză unică, introdusă cu ajutorul unei sonde gastrice sau al unei canule de intubație adecvate. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalelor de experiență. Acest volum nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală. Cu toate acestea, în cazul soluțiilor apoase se pot utiliza până la 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția cazului substanțelor iritante sau corozive care produc efecte exacerbate în concentrații mai mari, variațiile volumului administrat trebuie reduse la minimum prin ajustarea concentrației astfel încât să se mențină un volum constant la toate nivelurile dozei.

În cazul substanțelor administrate prin intermediul hranei sau al apei potabile este important ca bilanțul nutrițional sau hidric normal să nu fie afectat de cantitatea de substanță utilizată. Dacă substanța de testat se administrează prin hrană, există două posibilități: fie sub forma unei concentrații constante în alimentație (ppm), fie sub forma unei doze constante în raport cu greutatea corporală a animalului; trebuie să se precizeze alternativa utilizată. Dacă substanța se administrează prin gavaj, doza se administrează în fiecare zi aproximativ la aceeași oră, și se ajustează după cum este necesar pentru a menține un nivel constant al dozei în raport cu greutatea corporală a animalului. Dacă se realizează un studiu cu doză repetată ca studiu preliminar în vederea realizării unui studiu pe termen lung, în cadrul ambelor studii trebuie să se folosească regimuri alimentare similare. În cadrul studiilor de toxicitate acută, dacă nu se poate administra o doză unică, aceasta poate fi administrată în părți mai mici pe parcursul unei perioade de cel mult 24 de ore.

▼B

1.6. OBSERVAȚII

1.6.1. **Frecvența observațiilor și a testelor**

În cadrul studiilor cu doză repetată, perioada de observație trebuie să acopere întreaga perioadă de tratament. În cadrul studiilor de toxicitate acută, observațiile se realizează pe parcursul unei perioade de 14 zile post-tratament. Și animalele din grupurile satelit care nu sunt expuse pe parcursul unei perioade post-tratament trebuie observate pe parcursul aceleiași perioade.

Observațiile trebuie să fie suficient de frecvente pentru a maximiza probabilitatea de detectare a oricăror anomalii comportamentale și/sau neurologice. Observațiile se realizează de preferință în fiecare zi la aceeași oră, având în vedere și perioada pe parcursul căreia se estimează că efectele anticipate ale tratamentului sunt mai pronunțate. Tabelul 2 conține informații privind frecvența observațiilor clinice și a testelor funcționale. Dacă există date cinetice sau de altă natură obținute în cadrul unor studii anterioare care sugerează că sunt mai adecvate alte momente ale zilei pentru observații, teste sau pentru observațiile post-tratament, se adoptă un alt program care să permită colectarea cât mai multor informații posibil. Modificările programului trebuie justificate.

1.6.1.1. *Supravegherea stării generale de sănătate și a mortalității/morbidității*

Se examinează minuțios toate animalele cel puțin o dată pe zi, verificându-se starea lor de sănătate, iar mortalitatea și morbiditatea se verifică de două ori pe zi.

1.6.1.2. *Observații clinice detaliate*

Toate animalele selectate pentru a fi supuse unor examinări clinice detaliate (a se vedea tabelul 1) sunt supuse acestei examinări o dată înainte de prima expunere (pentru a permite realizarea de comparații pe același individ) și în continuare la diferite intervale, în funcție de durata studiului (a se vedea tabelul 2). Grupurile satelit pe care se studiază reversibilitatea efectelor sunt supuse unei examinări detaliate la sfârșitul perioadei de recuperare. Aceste examinări se efectuează într-o zonă standard, situată în afara cuștii în care se află animalele de obicei. Rezultatele se consemnează cu atenție, prin utilizarea unor sisteme de cotare incluzând criterii sau scale de cotare pentru fiecare dintre măsurătorile efectuate. Criteriile și scalele utilizate trebuie definite în mod explicit de către laboratorul care efectuează testul. Sunt necesare eforturi pentru a reduce la minimum variațiile condițiilor de testare (cu excepția celor legate de tratament) și pentru ca examinările să fie realizate de observatori experimentați care nu au fost informați cu privire la tratamentul administrat.

Se recomandă o abordare structurată, în cadrul căreia fiecărui animal studiat să i se aplice sistematic criterii clar definite (inclusiv definiția „intervalului” normal) la fiecare examinare. „Intervalul normal” se documentează în mod adecvat. Se înregistrează toate semnele observate. Dacă este posibil, se înregistrează și magnitudinea semnelor observate. Observațiile clinice vizează, dar nu în mod limitativ, modificările la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și reacțiile neurovegetative (de exemplu secreții lacrimale, piloerecție, dimensiunea pupilei, respirație neobișnuită și/sau respirație pe gură, urinare și/sau defecație neobișnuită, de exemplu decolorarea urinei).

▼B

Se consemnează și toate reacțiile neobișnuite legate de poziția corpului, de nivelul de activitate (de exemplu explorarea mai intensă sau mai redusă a zonei standard) și de coordonarea mișcărilor. Se consemnează, de asemenea, modificările mersului (de exemplu, mers legănat, ataxie), modificările posturii (de exemplu, cocoașe) și reacțiile la manipulare, la locul în care se află și la alți stimuli din mediu, precum și prezența unor mișcări clonice sau tonice, a convulsiilor sau a tremorului, comportamentul stereotip (de exemplu, curățarea excesivă, mișcări neobișnuite ale capului, mișcări circulare repetate) precum și comportamentele bizare (de exemplu, mușcături, lins excesiv, automutilare, mers înapoi, emiterea de sunete) sau agresivitatea.

1.6.1.3. *Teste funcționale*

Ca și observațiile clinice detaliate, testele funcționale se realizează pe toate animalele selecționate în acest scop (a se vedea tabelul 1) o dată înainte de expunere, iar apoi periodic. Frecvența testelor funcționale depinde și de durata studiului (a se vedea tabelul 2). Pe lângă perioadele de observare prevăzute în tabelul 2, se realizează și observații funcționale pe grupurile satelit, cât mai aproape de momentul sacrificării. Testele funcționale studiază reactivitatea senzorială la diferiți stimuli [de exemplu auditivi, vizuali și proprioceptivi (5) (6) (7)], forța de prehensiune (8) și activitatea motorie (9). Activitatea motorie se măsoară cu ajutorul unui dispozitiv automat care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității. Dacă se folosește un alt sistem anume, acesta trebuie să fie cantitativ, și să aibă o sensibilitate și o fiabilitate demonstrate. Fiecare dispozitiv se testează pentru a asigura fiabilitatea sa în timp și coerența rezultatelor obținute cu ajutorul diferitelor dispozitive. Referințele relevante conțin informații suplimentare privind procedurile care pot fi utilizate. Dacă nu există date (de exemplu, informații privind legătura dintre structură și activitate, date epidemiologice, alte studii toxicologice) privind potențialele efecte neurotoxice, trebuie avute în vedere teste mai specializate pentru explorarea funcțiilor senzorială și motorie sau a memoriei și a capacității de învățare. Referința (1) conține informații suplimentare privind teste mai specializate și utilizarea acestora.

În mod excepțional, animalele care prezintă semne marcate de toxicitate care ar putea afecta considerabil testul funcțional pot fi eliminate din cadrul acestui test. Eliminarea animalelor din cadrul unui test funcțional trebuie justificată.

1.6.2. **Greutatea corporală și consumul de hrană/apă**

În cadrul studiilor cu o durată de până la 90 de zile, toate animalele se cântăresc cel puțin o dată pe săptămână și se măsoară, de asemenea, și consumul de hrană (sau consumul de apă, dacă substanța de testat se administrează pe această cale) cel puțin săptămânal. În cadrul studiilor pe termen lung, toate animalele sunt cântărite cel puțin o dată pe săptămână pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi cel puțin o dată la 4 săptămâni. Se măsoară și consumul de hrană (sau consumul de apă, dacă substanța de testat se administrează pe această cale) cel puțin săptămânal pe parcursul primelor 13 săptămâni, iar apoi la intervale de aproximativ trei luni, cu excepția cazurilor în care trebuie procedat altfel din cauza stării de sănătate sau a greutății corporale.

▼B

1.6.3. **Examenul oftalmologic**

În cadrul studiilor cu o durată de peste 28 de zile, înainte de administrarea substanței de testat și la sfârșitul studiului, se realizează un examen oftalmologic cu ajutorul unui oftalmoscop sau al unui instrument echivalent adecvat, de preferință la toate animalele sau cel puțin la animalele din grupul căruia i-a fost administrată doza cea mai mare și la animalele din grupurile martor. Dacă se detectează modificări la nivelul ochilor sau dacă semnele clinice sugerează că este necesar, se examinează toate animalele. În cadrul studiilor pe termen lung se realizează și un examen oftalmologic la 13 săptămâni. Examenele oftalmologice nu sunt necesare dacă există deja date disponibile obținute în cadrul altor studii cu durată și doze similare.

1.6.4. **Hematologie și biochimie clinică**

În cazul studiilor de neurotoxicitate realizate în combinație cu un studiu de toxicitate sistemică cu doză repetată, examinările hematologice și determinările biochimice clinice se realizează în conformitate cu metoda utilizată în cadrul studiului de toxicitate sistemică. Probele se prelevează astfel încât să se reducă la minimum orice potențiale efecte asupra comportamentului neurologic.

1.6.5. **Histopatologie**

Examenul neuropatologic trebuie elaborat astfel încât să vină în completarea observațiilor realizate în etapa *in vivo* a studiului și să le aprofundeze. Se fixează *in situ* țesuturi de la cel puțin 5 animale/sex/grup (a se vedea tabelul 1 și paragraful următor) utilizându-se tehnicile obișnuite de perfuzare și de fixare (a se vedea referința 3, capitolul 5 și referința 4, capitolul 50). Se înregistrează toate modificările observabile importante. Dacă studiul se realizează independent în vederea depistării neurotoxicității sau pentru caracterizarea efectelor neurotoxice, restul animalelor pot fi utilizate fie pentru examinarea comportamentului neurologic (10) (11), pentru examinări neuropatologice (10) (11) (12) (13), neurochimice (10) (11) (14) (15) sau electrofiziologice (10) (11) (16) (17) în completarea procedurilor și a examinărilor descrise sau pot fi incluse între animalele supuse examenului histopatologic, mărind numărul acestora. Aceste proceduri suplimentare sunt deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice sau efectele anticipate sugerează un tip specific de neurotoxicitate sau o țintă a neurotoxicității (2) (3). Restul animalelor pot fi, de asemenea, utilizate pentru evaluările patologice de rutină din cadrul metodei utilizate în studiile cu doză repetată.

Toate probele de țesut acoperite cu parafină sunt supuse unei proceduri obișnuite de colorație, de exemplu colorație hematoxilin-eozină, și examinate la microscop. Dacă se observă semne de neuropatii periferice sau dacă există suspiciuni în acest sens, se examinează probe de țesut nervos periferic acoperite cu plastic. Semnele clinice pot recomanda, de asemenea, examinarea altor zone sau utilizarea unor proceduri speciale de colorație. Referințele 3 și 4 conțin informații privind alte zone care pot fi examinate suplimentar. Coloranții speciali pot fi utili și pentru evidențierea unor tipuri specifice de modificări patologice (18).

▼B

Se realizează și un examen histologic pe secțiuni reprezentative din sistemul nervos central și periferic (a se vedea referința 3, capitolul 5 și referința 4, capitolul 50). În mod normal zonele examinate includ: creierul anterior, centrul emisferelor cerebrale, inclusiv o secțiune din hipocamp, creierul central, cerebelul, puntea lui Varolio, bulbul rahidian, ochiul împreună cu nervul optic și retina, măduva spinării și protuberanțele cervicale și lombare, ganglionii din rădăcina posterioară, fibrele din rădăcinile posterioară și anterioară, nervul sciatic proximal, nervul tibial proximal (la nivelul genunchiului) și ramificațiile nervului tibial în mușchii gambei. Secțiunile din măduva spinării și din nervii periferici trebuie să fie atât transversale cât și longitudinale. Se acordă o atenție specială vascularizării sistemului nervos. Trebuie examinată și o probă de mușchi scheletici, în special de la nivelul gambei. Se acordă o atenție specială regiunilor din sistemul nervos central și din sistemul nervos periferic care au o structură celulară și fibroasă despre care se știe că sunt afectate în mod special de substanțele neurotoxice.

Referințele (3) și (4) conțin informații privind alterările neuropatologice tipice provocate de expunerea la substanțe neurotoxice. Se recomandă o examinare în etape a probelor de țesut, în cadrul căreia probele prelevate de la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai mare sunt comparate cu probele prelevate de la grupul martor. Dacă nu este identificată nicio alterare neuropatologică pe baza probelor de la aceste grupuri, nu mai sunt necesare alte analize. Dacă se observă alterări neurologice la grupul căruia i s-a administrat doza cea mai mare, trebuie codate și examinate succesiv probe din toate țesuturile care pot fi afectate, prelevate de la grupurile cărora li s-au administrat doza intermediară și doza cea mai redusă.

Dacă prin examinarea calitativă se evidențiază alterări neuropatologice, se realizează o a doua examinare a tuturor regiunilor sistemului nervos care prezintă astfel de alterări. Se realizează secțiuni din toate regiunile care pot fi afectate de la toate grupurile tratate, și se examinează aleatoriu fără a se cunoaște codul. Se înregistrează frecvența și gravitatea tuturor leziunilor. După evaluarea tuturor regiunilor pentru toate grupurile tratate, se poate realiza decodarea și se efectuează o analiză statistică în vederea determinării relației doză-răspuns. Trebuie descrise diversele niveluri de gravitate pentru fiecare leziune.

Rezultatele examenului neuropatologic se evaluează având în vedere observațiile și măsurătorile privind comportamentul, precum și alte date obținute prin studii de toxicitate sistemică anterioare sau concomitente asupra substanței de testat.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Rezultatele sunt indicate pentru fiecare animal în parte. Pe lângă aceasta, toate rezultatele sunt recapitulate într-un tabel care indică, pentru fiecare test sau grup martor, numărul de animale de la începutul testului, numărul de animale care au murit în timpul testului sau care au fost sacrificate în conformitate cu principiul minimei suferințe, momentul morții sau al sacrificării cu minimă suferință, numărul animalelor care prezentau semne de toxicitate, descrierea semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul apariției, durata, tipul și gravitatea efectelor toxice, numărul de animale care au prezentat leziuni, inclusiv tipul și gravitatea acestora.

▼B

2.2. EVALUAREA ŞI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele studiului se evaluează în vederea stabilirii frecvenței, a gravității și pentru corelarea efectelor neuropatologice și de comportament (și a efectelor neurochimice și electrofiziologice dacă se realizează examinări suplimentare) și a altor efecte adverse observate. Dacă este posibil, rezultatele numerice se evaluează cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Metodele statistice se aleg în etapa în care este conceput studiul.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

— natura fizică (inclusiv izomerizare, puritate, proprietăți fizice și chimice);

— date de identificare.

Vehiculul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului.

Animale de experiență:

— specia/rasa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa animalelor, condițiile de adăpostire, aclimatizare, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

— detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— precizări privind dozele administrate, inclusiv privind vehiculul, volumul și forma fizică a materialului administrat;

— detalii privind administrarea substanței de testat;

— justificarea dozei alese;

— justificarea căii și a duratei de expunere alese;

— transformarea concentrației substanței de testat administrate prin hrană/apa potabilă (ppm) în doză efectivă (mg/kilogram greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei.

Proceduri de observație și de testare:

— detalii privind repartizarea de animale din fiecare grup în sub-grupul perfuzat;

— detalii privind sistemele de evaluare, inclusiv criterii și scale de evaluare utilizate pentru fiecare măsurătoare din cadrul observațiilor clinice detaliate;

▼B

— detalii privind testele funcționale de explorare a reactivității senzoriale la diverși stimuli (de exemplu auditivi, vizuali și proprioceptivi); detalii privind evaluarea forței de prehensiune; detalii privind evaluarea activității motorii (inclusiv privind dispozitivele automate pentru detectarea activității) și detalii privind celelalte proceduri utilizate;

— date privind examenul oftalmologic și, dacă este cazul, examenele hematologice și testele de biochimie clinică, cu indicarea nivelurilor de referință relevante;

— detalii privind procedurile specifice de cercetare a modificărilor neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările acesteia, inclusiv greutatea la sacrificare;

— consumul de alimente și, după caz, de apă;

— reacția toxică pe sexe și pe doză, inclusiv semnele de toxicitate sau mortalitatea;

— natura, gravitatea și durata (momentul apariției și durata ulterioară) efectelor clinice observate (indiferent dacă sunt sau nu reversibile);

— descrierea detaliată a rezultatelor tuturor testelor funcționale;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor modificărilor neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice, dacă există;

— date privind absorbția și metabolismul, dacă există;

— tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor:

— informații privind relația doză-răspuns;

— legătura dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței de testat;

— nivelul concentrației la care nu se observă niciun efect advers.

Concluzii:

— se încurajează furnizarea unei aprecieri privind neurotoxicitatea globală a substanței de testat.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. In preparation.

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer. P. S. and Schauraburg, H. H. (1980). Spencer, P. S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 726-742.

▼B

5. Tupper D. E. and Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

7. Moser V. C., McDaniel, K. M. and Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl, Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C. and Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

9. Crofton, K. M., Haward, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reirer, L. W., Tilson, H. A. and MacPhail, R. C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H. A,, and Mitchell, C. L. eds. (1992), Neumtoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L. W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker. New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessement. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

13. Moser, V. C., Anthony, D. C., Sette, W. F. and MacPhail, R. C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

14. O'Callaghan J. P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

15. O'Callaghan J. P. and Miller, D. B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rut to Triethyltin Rcsults in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D. A., Lowndes, H. E. and Birkamper, G. G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp. 299-335.

17. Johnson, B. L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726-742.

18. Bancroft, J. D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques, Chapter 17, Neuropathological Techniques, Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabelul 1

Numărul minim de animale necesare pe grup pentru studiile de neurotoxicitate realizate separat sau în combinație cu alte studii

	STUDIU DE NEUROTOXICITATE REALIZAT:			
	Separat	În combinație cu un studiu de 28 de zile	În combinație cu un studiu de 90 de zile	În combinație cu un studiu de toxicitate cronică
Număr total de animale pe grup	10 masculi și 10 femele	10 masculi și 10 femele	15 masculi și 15 femele	25 masculi și 25 femele
Număr de animale selectate pentru testele funcționale, inclusiv pentru observații clinice detaliate	10 masculi și 10 femele	10 masculi și 10 femele	10 masculi și 10 femele	10 masculi și 10 femele
Număr de animale selectate pentru perfuzarea *in situ* și examinare neuro-histopatologică	5 masculi și 5 femele	5 masculi și 5 femele	5 masculi și 5 femele	5 masculi și 5 femele
Număr de animale selectate pentru studii cu doză repetată/subcronice/de toxicitate cronică, examinări hematologice, de biochimie clinică, histopatologie etc. conform dispozițiilor din *Linia directoare* relevantă		5 masculi și 5 femele	10 masculi † și 10 femele †	20 masculi † și 20 femele †
Observații suplimentare, după caz	5 masculi și 5 femele			

† Aici sunt incluse cinci animale selectate pentru teste funcționale și observații clinice detaliate din cadrul studiului de neurotoxicitate.

▼B

Tabelul 2

Frecvența observațiilor clinice și a testelor funcționale

Tipul observațiilor		Durata studiului			
		Acut	28 de zile	90 de zile	Cronic
La toate animalele	Stare generală de sănătate	zilnic	zilnic	zilnic	zilnic
	Mortalitate/ morbiditate	de două ori pe zi	de două ori pe zi	de două ori pe zi	de două ori pe zi
La animalele selectate pentru observații funcționale	Observații clinice detaliate	— înainte de prima expunere — în termen de 8 ore de la administrarea dozei, în momentul estimat al efectului maxim — în zilele 7 și 14 după administrarea dozei	— înainte de prima expunere — săptămânal în continuare	— înainte de prima expunere — o dată în prima sau a doua săptămână de după expunere — lunar în continuare	— înainte de prima expunere — o dată la sfârșitul primei luni de expunere — la fiecare trei luni în continuare
	Teste funcționale	— înainte de prima expunere — în termen de 8 ore de la administrarea dozei, în momentul estimat al efectului maxim — în zilele 7 și 14 după administrarea dozei	— înainte de prima expunere — în a patra săptămână de tratament, cât mai aproape posibil de sfârșitul perioadei de expunere	— înainte de prima expunere — o dată în prima sau a doua săptămână de după expunere — lunar în continuare	— înainte de prima expunere — o dată la sfârșitul primei luni de expunere — la fiecare trei luni în continuare

▼B

B.44. **ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA *IN VIVO***

1. **METODĂ**

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 427 (2004) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Expunerea la multe produse chimice are loc în principal prin piele în timp ce majoritatea studiilor toxicologice efectuate pe animale în laboratoare folosesc administrarea pe cale orală. Studiul asupra absorbției percutanate *in vivo* descris în metoda de față asigură conexiunea necesară pentru a extrapola rezultatele studiilor realizate prin administrare orală atunci când se realizează evaluări în materie de siguranță după expunerea cutanată.

O substanță trebuie să traverseze un număr mare de straturi celulare ale pielii înainte să pătrundă în sânge. Pentru cele mai multe substanțe, stratul care determină proporția de absorbție este stratul cornos compus din celule moarte. Permeabilitatea cutanată depinde atât de lipofilicitatea unor produși chimici și de grosimea stratului extern al epidermei, cât și de factori precum greutatea moleculară și concentrația substanței. În general, pielea șobolanilor și a iepurilor are o permeabilitate mai mare decât cea a oamenilor, în timp ce porcușorii de guineea și maimuțele au pielea asemănătoare cu cea a oamenilor.

Metodele pentru măsurarea absorbției percutanate pot fi împărțite în două categorii: *in vivo* și *in vitro*. Metoda *in vivo* este capabilă să furnizeze informații corespunzătoare asupra absorbției cutanate la diferite animale de laborator. Mult mai recent dezvoltate, metodele *in vitro* utilizează transportul parțial sau total prin stratul de piele umană sau animală până la un rezervor de fluid. Metoda *in vitro* este descrisă separat, în cadrul unei alte metode de testare (1). Pentru a alege metoda cea mai adecvată într-o situație dată, se recomandă să se consulte documentul de orientare al OCDE pentru realizarea de studii privind absorbția cutanată (2) care furnizează mai multe detalii privind pertinența metodelor *in vivo* și *in vitro*.

Metoda *in vivo*, descrisă în prezenta metodă, permite determinarea adâncimii de pătrundere prin piele a substanței de testare, în compartimentul sistemic. Tehnica a fost folosită la scară largă timp de mulți ani (3) (4) (5) (6) (7). Deși studiile cu privire la absorbția percutanată *in vitro* pot fi adecvate în multe cazuri, există situații în care doar un studiu *in vivo* poate să asigure informațiile necesare.

Avantajele metodei *in vivo* sunt următoarele: utilizarea unui sistem intact din punct de vedere fiziologic și metabolic, utilizarea unei specii comune multor studii de toxicitate și posibilitatea de modificare în vederea utilizării cu alte specii. Dezavantajele sunt: utilizarea animalelor vii, utilizarea materialului marcat radioactiv pentru a facilita fiabilitatea rezultatelor, dificultăți în determinarea fazei de absorbție precoce și diferențele de permeabilitate între pielea umană și cea a speciilor preferate (șobolani). Pielea animalelor este în general mai permeabilă, ceea ce poate duce la o supraestimare a absorbției percutanate la om (6) (8) (9). Substanțele caustice/corosive nu trebuie testate pe animale vii.

▼B

1.2. DEFINIȚII

Doza neabsorbită reprezintă cantitatea de substanță eliminată prin curățare de pe suprafața pielii după expunere și oricare altă cantitate prezentă pe pansamentul nonocluziv, inclusiv orice cantitate volatilizată de pe suprafața pielii în timpul expunerii.

Doza absorbită (*in vivo*) reprezintă cantitatea de substanță prezentă în urină, în reziduurile colectate la curățarea cuștii, în fecale, în aerul expirat (dacă este măsurat), în sânge, țesuturi (dacă sunt colectate) și pe carcasa rămasă, după îndepărtarea pielii corespunzătoare zonei de aplicare.

Doza absorbabilă reprezintă cantitatea de substanță prezentă pe piele sau în piele după curățare.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța testată, de preferință marcată radioactiv, este aplicată pe pielea rasă a animalelor în regim de dozaj normal sau adecvat, sub forma unui preparat caracteristic folosit în mod curent. Preparatul de testare rămâne în contact cu pielea o perioadă de timp stabilită sub pansament corespunzător (nonocluziv, semiocluziv sau ocluziv) pentru a preveni ingerarea acestuia. La finalul perioadei de expunere, pansamentul este îndepărtat și pielea este curățată cu agent de curățare adecvat, pansamentul și materialul folosit pentru aplicarea agentului de curățare sunt păstrate pentru analiză și se aplică un pansament nou. Înainte, în timpul și după perioada de expunere, animalele sunt adăpostite în cuști individuale metabolice, iar excrețiile și aerul expirat, pe parcursul acestor perioade, sunt colectate pentru analiză. Colectarea aerului expirat poate fi omisă dacă există suficiente informații care să confirme absența sau formarea în cantități limitate a unui metabolit volatil radioactiv. Fiecare studiu necesită în mod normal mai multe grupuri de animale care vor fi expuse la preparatul de testare. La finalul perioadei de expunere, animalele dintr-un lot sunt eutanasiate. Ulterior și alte loturi de animale sunt eutanasiate la intervale de timp planificate (2). La finalul perioadei de prelevare, animalele rămase sunt eutanasiate, sângele este colectat pentru analiză, zona folosită pentru aplicare este prelevată pentru analiză și carcasa este analizată pentru a găsi substanțele neexcretate. Se examinează probele prin mijloace adecvate și se estimează gradul de absorbție percutanată (6) (8) (9).

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Selectarea speciei de animale**

Specia cea mai des utilizată este șobolanul, dar pot fi folosite, de asemenea, speciile fără păr sau cele care au rata de absorbție cutanată mai apropiată de rata de absorbție la om (3) (6) (7) (8) (9). Se utilizează animale adulte tinere, sănătoase, de același sex (de regulă masculi), dintre speciile folosite de obicei în laborator. La începutul studiului, variația greutății animalelor utilizate nu trebuie să depășească ± 20 % din greutatea medie. De exemplu, se utilizează șobolani masculi cu greutatea cuprinsă între 200 și 250 g, în special șobolanii cu greutatea situată spre limita superioară a acestui interval.

▼B

1.4.2. **Numărul și sexul animalelor**

Pentru fiecare preparat de testare și fiecare programată se utilizează un lot de cel puțin patru animale de același sex. Fiecare lot de animale este eutanasiat la intervale de timp diferite, de exemplu la sfârșitul perioadei de expunere (de obicei 6 sau 24 de ore) și la sfârșitul altor perioadelor (de exemplu, 48 și 72 de ore). Dacă există date disponibile care să ateste diferențe semnificative între masculi și femele în ceea ce privește nivelul de toxicitate dermică, se alege sexul cel mai sensibil. Dacă nu există asemenea date, atunci se pot folosi animale de orice sex.

1.4.3. **Condiții de adăpostire și de hrănire**

Temperatura din camera experimentală trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentului în care se curăță camera, se tinde spre un nivel de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, succesiunea fiind de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. În timpul studiului și de preferință în perioada de aclimatizare, animalele sunt adăpostite în cuști metabolice separate. Din moment ce hrana și apa vărsate ar compromite rezultatele, riscurile unor astfel de evenimente trebuie reduse.

1.4.4. **Pregătirea animalelor**

Animalele sunt marcate pentru a permite identificarea individuală și sunt ținute în cuști timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea studiului pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator.

După perioada de aclimatizare și cu aproximativ 24 de ore înainte de dozare, pielea fiecărui animal va fi rasă pe o porțiune din zona omoplaților și spatelui. Proprietățile de permeabilitate ale pielii vătămate sunt diferite de proprietățile de permeabilitate ale pielii intacte; prin urmare, este necesară o atenție sporită pentru a nu zgâria pielea. După operațiunea de radere și cu aproximativ 24 de ore înainte ca substanța de testare să fie aplicată pe piele (a se vedea punctul 1.4.7) suprafața pielii trebuie ștearsă cu acetonă pentru a îndepărta sebumul. Nu se recomandă spălarea suplimentară cu apă și săpun deoarece orice depunere de săpun poate facilita absorbția substanței de testare. Suprafața trebuie să fie suficient de mare, de preferință de cel puțin 10 cm^2, pentru a permite calcularea cantității de substanță chimică absorbită pe cm^2 de piele. Această suprafață este practicabilă în cazul șobolanilor cu greutatea de 200-250 g. După pregătire, animalele sunt repuse în cuștile metabolice.

1.4.5. **Substanța de testare**

Substanța de testare reprezintă produsul ale cărui caracteristici de penetrare urmează să fie studiate. În mod ideal, substanța de testare trebuie să fie marcată radioactiv.

1.4.6. **Preparatul de testare**

Preparatul de testare (de exemplu material pur, diluat sau amestec care conține substanța chimică de testare aplicată pe piele) trebuie să fie același (sau un înlocuitor realist) cu preparatul la care pot fi expuși oamenii sau alte posibile specii țintă. Orice variație de la preparatul utilizat trebuie justificată. Atunci când este necesar, substanța de testare este dizolvată sau pusă într-o suspensie într-un mediu corespunzător Caracteristicile de absorbție și interacțiunea potențială cu substanța de testare trebuie cunoscute, pentru medii altele decât apa.

▼B

1.4.7. **Aplicarea pe piele**

Pe suprafața pielii se delimitează o zonă de aplicare de dimensiuni specifice. Ulterior, o cantitate cunoscută din preparatul de testare este uniform aplicată pe zona respectivă. În mod normal, această cantitate trebuie să simuleze expunerea umană potențială, de obicei 1-5 mg/cm^2 pentru solide și până la 10 µl/cm^2 pentru lichide. Orice alte cantități trebuie justificate prin condițiile de utilizare preconizate, obiectivele experimentului sau caracteristicile fizice ale preparatului de testare. După aplicare, zona tratată trebuie protejată astfel încât animalul să nu poată să se curețe. Figura 1 prezintă un exemplu de dispozitiv utilizat în acest scop. În mod normal, zona de aplicare este protejată printr-un pansament nonocluziv (de exemplu un pansament permeabil de tifon din nailon). Totuși, pentru aplicații nelimitate, zona de aplicare trebuie protejată cu un pansament ocluziv. În cazul în care de evaporarea substanțelor de testare semivolatile reduce gradul de recuperare al substanței de testare până la un nivel inacceptabil (a se vedea punctul 1.4.10, primul paragraf), este necesar să se capteze substanță evaporată într-un filtru de cărbune care acoperă dispozitivul de aplicare (a se vedea figura 1). Este important ca niciun dispozitiv să nu producă vătămări ale pielii, să nu absoarbă sau să nu reacționeze cu preparatul de testare. Animalele sunt aduse înapoi în cuștile individuale metabolice pentru colectarea excrementelor.

1.4.8. **Durata expunerii și recoltarea probelor**

Durata expunerii reprezintă intervalul de timp cuprins între aplicarea și îndepărtarea preparatului de testare prin spălarea pielii. Se utilizează o perioadă de expunere relevantă (de obicei de 6 sau 24 de ore), în funcție de durata de expunere umană presupusă. După perioada de expunere, animalele sunt ținute în cuștile metabolice până la termenul prevăzut. În timpul perioadei de studiu, animalele trebuie ținute sub observație la intervale regulate, pentru depistarea simptomelor de toxicitate/reacții anormale. La sfârșitul perioadei de expunere, pielea tratată trebuie cercetată pentru depistarea semnelor vizibile de iritație.

Cuștile metabolice trebuie să faciliteze colectarea separată a urinei și fecalelor pe tot parcursul studiului. Ele trebuie să permită, de asemenea, colectarea de dioxid de carbon ^{14}C și compuși de carbon ^{14}C volatili, care trebuie analizați atunci când sunt produși într-o cantitate (> 5 %). Urina, fecalele și fluidele recuperate (de exemplu dioxid de carbon ^{14}C și compuși de carbon ^{14}C volatili) trebuie colectate individual de la fiecare lot la fiecare interval de recoltare a probelor. Dacă există suficiente informații că nu se formează niciun metabolit volatil radioactiv sau că este prezent în cantități mici, se pot utiliza cuști deschise.

Excrementele sunt colectate pe parcursul perioadei de expunere, până la 24 de ore de la contactul inițial cu pielea și ulterior în fiecare zi până la finalul experimentului. În mod normal, trei intervale de colectare a excrementelor sunt suficiente, dar, în funcție de scopul preconizat pentru preparatul de testare sau de datele cinetice existente, poate fi necesar să se prevadă intervale de timp suplimentare sau adaptate pentru studiu.

La sfârșitul perioadei de expunere, dispozitivul de protecție este îndepărtat de la fiecare animal și păstrat separat pentru analiză. Pielea tratată a tuturor animalelor trebuie spălată de cel puțin trei ori cu agent de curățare folosind tampoane adecvate. Trebuie evitată contaminarea celorlalte părți ale corpului. Agentul de curățare trebuie să fie reprezentativ pentru practicile de igienă normale (de exemplu, soluție apoasă de săpun). La final, pielea trebuie uscată. Toate tampoanele și materialele de curățare trebuie păstrate pentru analiză. Animalelor din loturile stabilite pentru observații ulterioare li se aplică, înainte de repunerea în cuștile individuale, un pansament nou pentru a proteja zona tratată.

▼B

1.4.9. **Proceduri finale**

Pentru fiecare lot, fiecare animal trebuie eutanasiat la momentul de timp prevăzut, iar sângele trebuie colectat pentru analiză. Dispozitivul protector sau pansamentul trebuie îndepărtate pentru analiză. Pielea din zona de aplicare și o suprafață similară de piele rasă pe care nu s-a aplicat nicio substanță trebuie prelevate de la fiecare animal pentru o analiză separată. Zona de aplicare poate fi fracționată pentru separarea stratului cornos de epiderma de bază pentru a furniza mai multe informații asupra dispunerii substanței chimice. Determinarea acestei dispuneri pe parcursul unui interval de timp, după perioada de expunere, trebuie să furnizeze indicii asupra comportamentului oricărei substanțe chimice în stratul cornos. Pentru a facilita fracționarea pielii (după spălarea finală a pielii și eutanasierea animalului), se îndepărtează orice pansamentul protector. Pielea din zona de aplicare, împreună cu o suprafață de piele circulară din jurul zonei de aplicare este prelevată și fixată în ace pe o planșetă. Pe suprafața de piele se aplică o fâșie de bandă adezivă exercitând o presiune moderată și se îndepărtează banda o dată cu stratul cornos. Se aplică fâșii succesive de bandă până când banda respectivă nu mai aderă la suprafața de piele, atunci când toată porțiunea de strat cornos a fost îndepărtată. Toate fâșiile de bandă adezivă, care provin de la același animal, pot fi amestecate într-un singur recipient în care se adaugă un digestiv de țesut pentru a solubiliza stratul cornos. Se pot îndepărta orice țesuturi-țintă potențiale pentru măsurători separate înainte ca carcasa rămasă să fie analizată pentru determinarea dozei absorbite. Carcasele animalelor sunt reținute pentru analiză. O analiză a conținutului total este de obicei suficientă. Organele țintă pot fi îndepărtate pentru analiză separată (dacă acest lucru este indicat de către alte studii). Urina prezentă în vezică în momentul planificat pentru eutanasiere se adaugă la urina colectată anterior. După colectarea excrementelor din cuștile metabolice în momentul planificat pentru eutanasiere, cuștile și trapele lor trebuie spălate cu un solvent corespunzător. Se analizează, în egală măsură, orice alt echipament potențial contaminat.

1.4.10. **Analiza**

În toate studiile trebuie să se obțină un nivel adecvat de recuperare (respectiv o medie de 100 ± 10 % de radioactivitate). Recuperările în afara acestui interval trebuie justificate. Cantitatea dozei administrate în fiecare mostră trebuie analizată prin proceduri validate în mod corespunzător.

Considerațiile de natură statistică trebuie să includă o măsurare a variației testelor repetate pentru fiecare aplicație.

2. **DATE**

Pentru fiecare animal, la fiecare interval de prelevare trebuie efectuate următoarele măsurători pentru depistarea substanței chimice de testare și/sau a metaboliților. În afară de datele individuale, datele grupate în funcție de intervalele de prelevare se raportează sub formă de medii:

— cantitatea asociată cu dispozitivele de protecție;

— cantitatea care poate fi îndepărtată de pe piele;

— cantitatea din/de pe piele care nu poate fi spălată;

▼B

— cantitatea prezentă în probele de sânge;

— cantitatea din excremente și aerul expirat (dacă este cazul);

— cantitatea care rămâne în carcasă și orice organe îndepărtate pentru analiză separată.

Cantitatea de substanță de testare și/sau metaboliții din excremente, din aerul expirat, din sânge și din carcasă permit determinarea cantității totale absorbite la fiecare interval de timp. De asemenea, se poate calcula cantitatea de substanță chimică de testare absorbită pe cm^2 de piele expusă la substanța de testare pe parcursul perioadei de expunere.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cerințele stipulate în protocolul de testare, inclusiv o justificare pentru sistemul de testare utilizat și trebuie să cuprindă următoarele:

Substanța de testare:

— date de identificare [număr CAS, dacă este disponibil, sursă, puritate (puritatea radiochimică), impurități cunoscute, număr lot];

— stare fizică, proprietăți fizico-chimice (de exemplu pH, volatilitate, solubilitate, stabilitate, greutate moleculară și coeficientul de partiție octanol/apă – log P_{ow})

Pregătirea testului:

— formularea și justificarea utilizării;

— detalii referitoare la pregătirea testului, cantitatea aplicată, concentrațiile obținute, mijloacele, stabilitatea și omogenitatea.

Animalele testate:

— speciile/rasele utilizate;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— proveniența animalelor, condiții de adăpostire, diete, etc;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condițiile de testare:

— detalii cu privire la administrarea preparatului de testare (zonă de aplicare, metode de tastare, ocluzie/non-ocluzie, volum, extracție, detectare);

— detalii cu privire la calitatea hranei și apei.

Rezultate:

— orice semne de toxicitate;

— date privind absorbția, prezentate sub formă de tabel (exprimate ca rată, cantitate sau procent);

▼B

— recuperări totale ale experimentului;

— interpretarea rezultatelor, comparație cu alte date disponibile privind absorbția percutanată a substanței de testare.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOFRAFICE**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

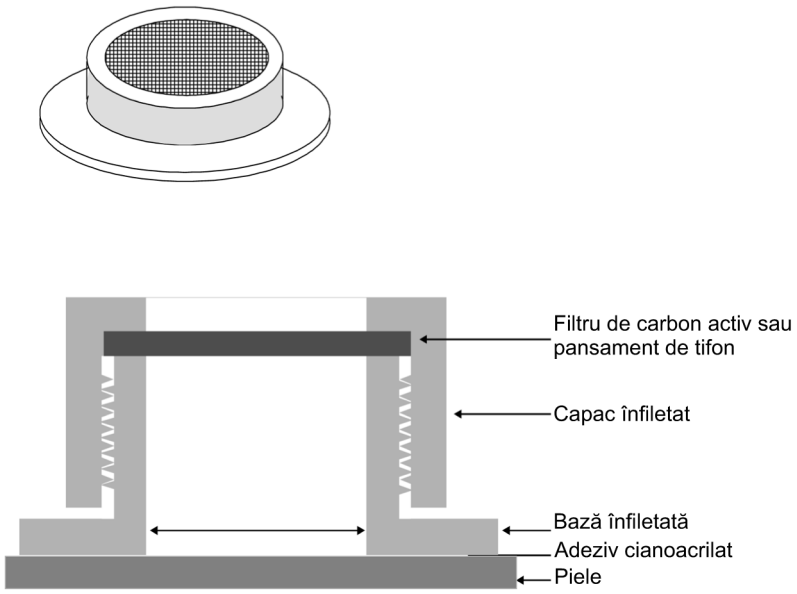
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Exemplu de dispozitiv clasic utilizat pentru delimitarea și protejarea zonei de aplicare în timpul studiilor de absorbție percutanată *in vivo*



▼B

B.45. **ABSORBȚIA CUTANATĂ: METODA DE TESTARE *IN VITRO***

1. **METODĂ**

Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 428 (2004) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Prezenta metodă a fost concepută pentru a furniza informații cu privire la absorbția unei substanțe de testare aplicată pe un eșantion de piele excizată. Metoda poate fi folosită fie în combinație cu metoda de absorbție cutanată: metoda *in vivo* (1), fie separat. În vederea elaborării studiilor bazate pe prezenta metodă se recomandă consultarea documentului de orientare al OCDE pentru realizarea de studii privind absorbția cutanată (2). Documentul de orientare a fost elaborat pentru a facilita alegerea procedurilor *in vitro* adecvate utilizării în situații specifice, care să asigure fiabilitatea rezultatelor obținute cu ajutorul acestei metode.

Metodele de măsurare a absorbției cutanate și a expunerii dermice pot fi împărțite în două categorii: *in vivo* și *in vitro*. Metodele *in vivo* de măsurare a absorbției cutanate sunt bine cunoscute și furnizează date farmacokinetice în cazul mai multor specii de animale. Metoda *in vivo* este descrisă separat în cadrul unei alte metode de testare (1). Metodele *in vitro* au fost utilizate timp de mai mulți ani pentru măsurarea absorbției cutanate. Cu toate că nu s-au efectuat studii de validare a metodelor *in vitro* incluse în prezenta metodă de testare, experții OCDE au stabilit în 1999 că există suficiente date evaluate pentru susținerea metodei *in vitro* (3). Documentul de orientare (2) furnizează detalii suplimentare care fundamentează această decizie, printre care și un număr important de comparații directe între metodele *in vitro* și *in vivo*. Există o serie de monografii care tratează acest subiect și prezintă un context amănunțit al utilizării metodei *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Metodele *in vitro* măsoară difuzia substanțelor chimice în piele și prin piele până la un rezervor de fluid; acestea utilizează eșantioane de piele neviabilă, pentru a măsura doar difuzia sau eșantioane de piele proaspătă, activă din punct de vedere metabolic, pentru a măsura simultan difuzia și metabolismul cutanat. Astfel de metode sunt folosite pentru a compara absorbția, în piele și prin piele, a diferite formule de substanțe chimice, furnizând în același timp modele utile pentru evaluarea absorbției percutanate la om.

Metoda *in vitro* nu se poate aplica în toate cazurile sau clasele de substanțe chimice, dar poate fi folosită pentru o evaluare preliminară calitativă a penetrației cutanate. În anumite cazuri poate fi nevoie și de completarea acesteia cu datele *in vivo*. Se recomandă consultarea documentului de orientare (2) pentru a stabili situațiile în care utilizarea metodei *in vitro* este adecvată. Referința (3) furnizează informații detaliate suplimentare pentru a facilita luarea unei decizii.

Prezenta metodă prezintă principiile generale pentru măsurarea absorbției cutanate și a difuziei unei substanțe de testare folosind un eșantion de piele excizată. Se poate folosi piele de la multe specii mamifere, inclusiv de la om. Proprietățile de permeabilitate ale pielii se păstrează după excizie pentru că obstacolul principal în calea difuziei este stratul cornos neviabil; nu s-a identificat nicio formă de transport activ al substanțelor chimice prin piele. S-a observat că pielea posedă capacitatea de metabolizare a unor substanțe chimice în timpul absorbției percutanate (6), însă acest proces nu limitează proporția dozei reale absorbite, deși poate afecta natura substanței care intră în fluxul sanguin.

▼B

1.2. DEFINIȚII

Doză neabsorbită: reprezintă cantitatea de substanță eliminată prin curățare de la suprafața pielii după expunere, precum și oricare altă cantitate prezentă pe pansamentul neocluziv, inclusiv orice cantitate volatilizată de pe suprafața pielii în timpul expunerii.

Doză absorbită (*in vitro*): masă de substanță de testare care ajunge la fluidul receptor sau în circulația sistemică într-o perioadă de timp stabilită.

Doză absorbabilă (*in vitro*): reprezintă cantitatea de substanță prezentă pe piele sau în piele după curățare.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Substanța de testare, marcată radioactiv după caz, este aplicată pe suprafața unui eșantion de piele care separă cele două camere ale unei celule de difuzie. Înainte de a fi îndepărtată printr-o procedură corespunzătoare de curățare, substanța chimică rămâne pe piele în condiții specifice și pentru o perioadă determinată de timp. Fluidul receptor este prelevat la intervale stabilite în cursul perioadei de testare și analizat pentru a căuta substanța de testare și/sau metaboliți.

Atunci când sunt utilizate sisteme metabolic active, metaboliții substanței chimice de testare pot fi analizați utilizând metode corespunzătoare. La sfârșitul experimentului se cuantifică distribuția substanței chimice de testare și a metaboliților.

Absorbția substanței de testare pe o perioadă de timp determinată este măsurată cu ajutorul analizei fluidului receptor și a pielii tratate, în condițiile corespunzătoare descrise în cadrul prezentei metode și în documentul de orientare (2). Dacă nu se poate demonstra că absorbția poate fi determinată numai cu ajutorul valorilor fluidului receptor, substanța de testare rămasă în piele trebuie considerată ca și absorbită. Analiza altor componente (materialul curățat de pe piele și cel rămas în straturile pielii) permite continuarea evaluării datelor, inclusiv evacuarea totală a substanței de testare și procentajul de recuperare.

Pentru a demonstra funcționarea și fiabilitatea sistemului de testare în laboratorul în care se efectuează studiul, trebuie să fie disponibile rezultatele obținute pentru substanțele chimice de referință, în concordanță cu literatura de specialitate referitoare la metoda folosită. Această cerință poate fi îndeplinită prin testarea unei substanțe de referință corespunzătoare (care prezintă, de preferință, o lipofilicitate apropiată de substanța de testare) în paralel cu substanța de testare sau prin furnizarea unui istoric adecvat al datelor referitoare la un anumit număr de substanțe de referință cu lipofilicitate diferită (de exemplu cofeină, acid benzoic și testosteron).

1.4. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.4.1. **Celula de difuzie**

Celula de difuzie este formată dintr-o cameră donatoare și o cameră receptoare, grefa de piele fiind așezată între acestea (un exemplu de model tipic este prezentat în figura 1). Celula trebuie să asigure o etanșare perfectă în jurul pielii, să permită o prelevare ușoară și amestecare bună a soluției receptoare în contact cu partea inferioară a pielii, precum și o bună supraveghere a temperaturii din celulă și a conținutului acesteia. Sunt acceptate celule de difuzie atât statice, cât și dinamice. În mod normal, camerele donatoare sunt lăsate deschise în timpul expunerii la o doză limitată dintr-un preparat de testare. Totuși, camerele donatoare pot fi închise pentru aplicații nelimitate și în anumite cazuri cu doze limitate.

▼B

1.4.2. **Fluidul receptor**

Se preferă folosirea unui fluid receptor care favorizează fenomenele fiziologice, deși se pot folosi și alte fluide, cu condiția ca acestea să fie justificate. Se furnizează compoziția exactă a fluidului receptor. Se demonstrează solubilitatea corespunzătoare a substanței chimice de testare în fluidul receptor, astfel încât aceasta să nu acționeze ca o barieră pentru absorbție. În plus, fluidul receptor nu trebuie să afecteze integritatea de preparare a pielii. Într-un sistem dinamic, viteza de scurgere nu trebuie să împiedice difuzia substanței de testare în fluidul receptor. Într-un sistem celular static, fluidul trebuie amestecat continuu și recoltat în mod regulat. Dacă se studiază metabolismul, fluidul receptor trebuie să întrețină viabilitatea pielii pe parcursul experimentului.

1.4.3. **Preparatul de piele**

Se poate folosi piele de origine umană sau animală. Se cunoaște faptul că folosirea pielii umane este supusă considerentelor și condițiilor etice naționale și internaționale. Deși se preferă pielea viabilă, se poate folosi și piele neviabilă, cu condiția ca integritatea pielii să poată fi demonstrată. Se acceptă atât membrane epidermice (separate enzimatic, termic sau chimic), cât și eșantioane de piele cu grosime limitată (în mod tipic, cu grosimea cuprinsă între 200-400 μm) prelucrată cu un dermatom. Se poate folosi piele cu grosime integrală, însă trebuie evitată folosirea grosimii excesive (aproximativ > 1 mm), cu excepția cazului în care este necesar pentru determinarea substanței chimice din straturile de piele. Trebuie explicată selecția speciilor, zona anatomică și tehnica de preparare. Trebuie furnizate date acceptabile de la minimum patru mostre pentru fiecare preparat de testare.

1.4.4. **Integritatea preparatului de piele**

Este esențial ca pielea să fie preparată în mod adecvat. Manevrarea incorectă poate duce la deteriorarea stratului cornos, așadar trebuie verificată integritatea pielii preparate. Atunci când se studiază metabolismul pielii, pielea excizată proaspăt trebuie folosită cât mai repede posibil și în condiții despre care se știe că favorizează activitatea metabolică. În general, pielea proaspăt excizată trebuie folosită în termen de 24 de ore, însă perioada acceptabilă de stocare poate varia în funcție de sistemul enzimatic implicat în metabolism și de temperaturile de stocare (13). Atunci când preparatele de piele au fost stocate înainte de utilizare, trebuie dovedit că și-au păstrat funcția de barieră.

1.4.5. **Substanța de testare**

Substanța de testare reprezintă produsul ale cărui caracteristici de penetrare urmează să fie studiate. În mod ideal, substanța de testare este marcată radioactiv.

1.4.6. **Preparatul de testare**

Preparatul de testare (de exemplu materialul pur, diluat sau amestec care conține substanța de testare aplicată pe piele) trebuie să fie același (sau un înlocuitor realist) cu preparatul la care pot fi expuși oamenii sau alte specii țintă posibile. Orice variație de la preparatul utilizat trebuie justificată.

▼B

1.4.7. **Concentrațiile și formulele substanțelor de testare**

În mod normal se folosesc mai multe concentrații ale substanței de testare, astfel încât să se acopere valorile superioare din gama de expuneri potențiale în cazul oamenilor. În egală măsură, se poate lua în considerare testarea unei serii de formule tipice.

1.4.8. **Aplicarea pe piele**

În condiții normale, omul este supus expunerilor la substanțe chimice în doze limitate. Prin urmare, se folosește o aplicare care simulează expunerea umană, în mod normal de 1-5 mg/cm^2 de piele pentru solide și până la 10 $\mu l/cm^2$ pentru lichide. Cantitatea este explicată de condițiile presupuse de folosire, de obiectivele studiului sau de caracteristicile fizice ale preparatului de testare. De exemplu, aplicările pe suprafața pielii pot fi nelimitate atunci când se aplică volume mari pe unitate de suprafață.

1.4.9. **Temperatura**

Difuzia pasivă a substanțelor chimice (prin urmare și absorbția acestora în piele) este afectată de temperatură. Camera de difuzie și pielea trebuie menținute la o temperatură constantă apropiată de temperatura normală a pielii de 32 ± 1 °C. În funcție de modele de celule, temperatura băii sau blocului încălzit poate varia, pentru a asigura respectarea normei fiziologice a receptorului/pielii. Se preferă ca umiditatea să fie între 30 și 70 %.

1.4.10. **Durata expunerii și prelevarea**

Expunerea pielii la preparatul de testare poate avea loc pe durata întregului experiment sau pe o perioadă mai scurtă (pentru a imita un anumit tip de expunere a omului). Pielea se curăță de surplusul de preparat de testare cu ajutorul unui agent de curățare corespunzător, iar materialul rezultat în urma curățării este colectat pentru analiză. Procedura de eliminare a preparatului de testare depinde de condițiile de utilizare prevăzute și trebuie să fie justificată. O caracterizare adecvată a profilului de absorbție necesită, în mod normal, o perioadă de 24 de ore de prelevare a probelor. Perioadele de prelevare nu trebuie să depășească în mod normal 24 de ore, deoarece integritatea pielii poate începe să se deterioreze. În cazul substanțelor de testare care penetrează pielea rapid nu este nevoie de această perioadă de 24 de ore, însă în cazul substanțelor care penetrează încet, poate fi nevoie de perioade mai lungi de timp. Frecvența de prelevare a fluidului receptor ar trebui să permită prezentarea grafică a profilului de absorbție a substanței de testare.

1.4.11. **Proceduri finale**

Trebuie analizate toate componentele sistemului de testare (camera donatoare, materialul rezultat în urma curățării suprafeței de piele, preparatul de piele și camera receptoare/fluidul receptor), iar rata de recuperare trebuie determinată. În unele cazuri, pielea poate fi fracționată în zona de piele expusă și zona de piele sub marginea celulei și în fracțiuni de strat cornos, epidermă și dermă destinate unei analize separate.

1.4.12. **Analiza**

În toate studiile trebuie să se obțină un nivel adecvat de recuperare (respectiv o medie de 100 ± 10 % de radioactivitate) Recuperările în afara acestui interval trebuie justificate. Cantitatea de substanță de testare din fluidul receptor, din preparatul de piele, din materialul rezultat în urma curățării suprafeței pielii și din resturile din dispozitiv sunt analizate printr-o procedură corespunzătoare.

▼B

2. **DATE**

Se prezintă analiza fluidului receptor, distribuția substanței chimice testate în sistemul de testare și profilul absorbției în timp. Atunci când are loc expunerea la doze limitate, se calculează cantitatea curățată prin spălare de pe piele, cantitatea prezentă în piele (inclusiv în diferite straturi de piele, în cazul în care există o analiză) și cantitatea prezentă în fluidul receptor (rata și cantitatea sau procentul din doza aplicată). Absorbția cutanată poate fi uneori exprimată doar cu ajutorul datelor fluidului receptor. Totuși, atunci când substanța de testare rămâne în piele la sfârșitul studiului, poate fi necesară includerea acesteia în cantitatea totală absorbită (a se vedea alineatul 66 din referința 3). Atunci când are loc expunerea la doze nelimitate, datele pot permite calcularea unei constante de permeabilitate (Kp). În aceste condiții, procentul absorbit este irelevant.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cerințele stipulate în protocol, inclusiv justificarea sistemului de testare utilizat, și trebuie să cuprindă următoarele:

Substanța de testare:

— stare fizică, proprietăți fizico-chimice (cel puțin greutatea moleculară și coeficientul de partiție octanol/apă – log P_{ow}), puritate (puritatea radiochimică);

— date de identificare (de exemplu numărul de lot);

— solubilitatea în fluidul receptor.

Preparatul de testare:

— formula și justificarea utilizării;

— omogenitatea.

Condiții de testare:

— sursele și locul pielii, metoda de preparare, condițiile de stocare înainte de folosire, orice tratări preliminare (curățare, tratare cu antibiotice etc.), măsurători de integritate a pielii, statutul metabolic, justificarea utilizării;

— modelul celulei, compoziția fluidului receptor, viteza de scurgere a fluidului receptor sau intervalele și procedeele de prelevare;

— detalii privind aplicarea preparatului de testare și cuantificare a a dozei aplicate;

— durata de expunere;

— detalii privind înlăturarea preparatului de testare de pe piele, de exemplu curățarea prin spălare a pielii;

— detalii privind analiza pielii și tehnicile de fracționare utilizate pentru a demonstra distribuția în piele;

▼B

— procedurile de spălare a celulei și a aparaturii;

— metodele de analiză, tehnicile de extracție, limitele de detectare și validarea metodei analitice.

Rezultate:

— recuperările totale ale experimentului (doza aplicată ≡ spălări ale pielii + piele + fluid receptor + spălări ale celulei);

— întocmirea unui tabel cu recuperările fiecărei celule în fiecare compartiment;

— profilul absorbției;

— întocmirea unui tabel cu datele absorbției (exprimate ca rată, cantitate sau procent).

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Anexa 1 la ENV/JM/TG(2 000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen B. W. and Reifenrath W. G. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh R.L. and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pag. 237-241.

6. Bronaugh R. L. and Maibach H. I. (1991). In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monografia No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F. Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., Paye M., Spengler J., Steiling W. (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, Nr. 65.

10. Howes D., Guy R, Hadgraft J., Heylings JR *et al*. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

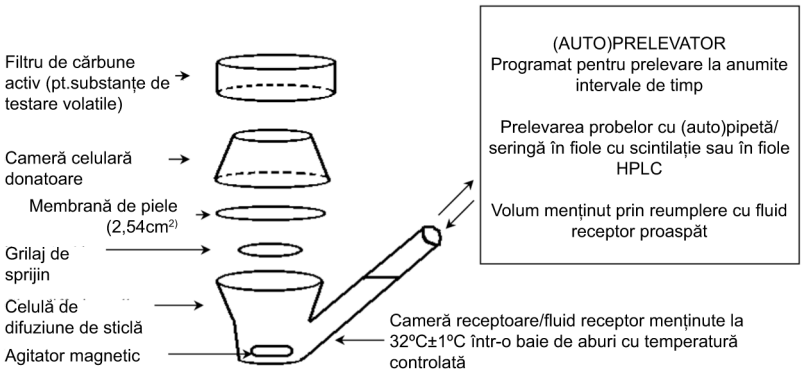
11. Schaefer H. and Redelmeier T. E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts M. S. and Walters K. A. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, J. R., Clowes, H. M. And Williams, F. M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Exemplu de model tipic al celulei de difuzie statică pentru studiile *in vitro* a absorbției percutanate



▼M8

B.46. IRITAȚIA CUTANATĂ *IN VITRO*: METODĂ DE TESTARE PE EPIDERMĂ UMANĂ RECONSTRUITĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 439 (2015). Iritația cutanată înseamnă producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de patru ore [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare asigură o procedură *in vitro* care poate fi folosită pentru identificarea riscurilor asociate substanțelor chimice iritante (substanțe și amestecuri) în conformitate cu GHS al ONU/ categoria 2 prevăzută în Regulamentul CLP (2). În regiunile care nu adoptă categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) prevăzută în GHS al ONU, această metodă de testare poate fi utilizată, de asemenea, pentru identificarea substanțelor chimice neclasificate. Prin urmare, în funcție de cadrul de reglementare și de sistemul de clasificare utilizat, prezenta metodă de testare poate fi utilizată pentru a determina caracterul iritant pentru piele al substanțelor chimice fie ca un test independent de substituire pentru testarea iritației cutanate *in vivo*, fie ca test de substituire parțială în cadrul unei strategii de testare (3).

2. Evaluarea iritației cutanate a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator (MT B.4, echivalentă cu Orientarea nr. 404 a OCDE adoptată inițial în 1981 și revizuită în 1992, 2002 și 2015) (4). Pentru testarea corozivității, trei metode de testare *in vitro* validate au fost adoptate ca MT B.40 UE (echivalentul Orientării TG nr. 430 a OCDE), MT B.40bis (echivalentul Orientării TG nr. 431 a OCDE) și MT B.65 (echivalentul Orientării TG nr. 435 a OCDE) (5) (6) (7). Un document de orientare privind strategiile integrate de testare și evaluare al OCDE (Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment - IATA) pentru coroziunea și iritația cutanată descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și oferă îndrumări cu privire la (i) modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanate și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare (3).

3. Prezenta metodă de testare abordează iritația cutanată având drept punct final sănătatea umană. Aceasta se bazează pe sistemul de testare *in vitro* a epidermei umane reconstruite (RhE), care prezintă proprietăți biochimice și fiziologice similare proprietăților părților superioare ale pielii umane, și anume epiderma. Sistemul de testare pe RhE utilizează keratinocite de origine umană netransformate ca sursă celulară pentru a reconstitui un model de epidermă cu histologie și citoarhitectură reprezentativă. Există standarde de performanță (SP) pentru a facilita validarea și evaluarea metodelor de testare bazate pe RhE similare și modificate, în conformitate cu principiile documentului de orientare nr. 34 al OCDE (8) (9). Orientarea corespunzătoare privind testarea a fost inițial adoptată în 2010, actualizată în 2013 pentru a include metode RhE suplimentare și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a introduce utilizarea unei proceduri alternative pentru măsurarea viabilității.

4. Au fost realizate studii de prevalidare, optimizare și validare pentru patru modele de testare *in vitro* disponibile în comerț (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) pe baza sistemului de testare pe RhE (sensibilitate de 80 %, specificitate de 70 % și precizie de 75 %). Aceste patru modele de testare sunt incluse în prezenta

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

metodă de testare și sunt prezentate în apendicele 2, care oferă, de asemenea, informații cu privire la tipul de studiu de validare folosit pentru validarea metodelor de testare respective. Astfel cum s-a menționat în apendicele 2, metoda de referință validată (MRV) a fost utilizată pentru a dezvolta prezenta metodă de testare și standardele de performanță (8).

5. Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai pentru modelele de testare validate în conformitate cu standardele de performanță (8), în cazul în care aceste modele de testare au fost revizuite și adoptate de OCDE. Modelele de testare incluse în prezenta metodă de testare și în orientarea privind testarea a OCDE pot fi utilizate în mod nediscriminatoriu pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor din metodele de testare *in vitro* pentru iritația cutanată, în același timp beneficiind de acceptarea reciprocă a datelor.

6. În apendicele 1 sunt prezentate definițiile termenilor utilizați în prezentul document.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

7. Una dintre limitările metodei de testare, astfel cum a fost demonstrată prin studiul prospectiv complet de validare care evaluează și caracterizează metodele de testare pe RhE (16), este aceea că aceasta nu permite clasificarea substanțelor chimice în categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) din GHS al ONU (1). Astfel, cadrul de reglementare din statele membre va decide modul în care va fi utilizată această metodă de testare. Pentru UE, categoria 3 nu a fost preluată în Regulamentul CLP. Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (3). Este recunoscut faptul că utilizarea de piele umană face obiectul considerațiilor etice și al condițiilor stabilite la nivel național și internațional.

8. Prezenta metodă de testare abordează iritația cutanată având drept punct final sănătatea umană. Chiar dacă această metodă de testare nu furnizează informații adecvate privind coroziunea cutanată, ar trebui remarcat faptul că capitolul B.40bis (orientarea OCDE privind testarea nr. 431) privind coroziunea cutanată din MT se bazează pe același sistem de testare RhE, dar se utilizează un alt protocol (6). Prezenta metodă de testare se bazează pe modele RhE care utilizează keratinocite umane care reprezintă așadar *in vitro* organul țintă al speciei studiate. În plus, aceasta acoperă direct etapa inițială a cascadei inflamatorii/mecanismului de acțiune (leziuni celulare și ale țesuturilor cauzând un traumatism localizat) care apare în timpul iritației *in vivo*. În cadrul procesului de validare a acestei metode de testare a fost testată o gamă largă de substanțe chimice, iar baza de date empirice a studiului de validare a ajuns să cuprindă în total 58 de substanțe chimice (16) (18) (23). Metoda de testare este aplicabilă substanțelor solide, lichide, semi-solide și cerurilor. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul unui studiu de validare (29). Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

9. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Însă, datorită faptului că amestecurile acoperă un spectru larg de categorii și compoziții și că, în prezent, sunt disponibile doar informații limitate privind testarea amestecurilor, în cazurile în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la o categorie specifică de amestecuri [de

▼**M8**

exemplu, în urma unei strategii propuse de Eskes *et al.*, 2012 (30)], metoda de testare nu ar trebui să fie utilizată pentru respectiva categorie specifică de amestecuri. Ar trebui să se aplice un tratament similar în cazul în care se constată că clasele chimice specifice sau proprietățile fizico-chimice nu sunt aplicabile pentru actuala metodă de testare.

10. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT, și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate celulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții (a se vedea punctele 28-34).

11. Un singur test compus din trei țesuturi duplicate ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. În schimb, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale duplicatelor și/sau un procent mediu al viabilității egal cu 50 ± 5 %, ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea test în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Substanța chimică de testat se aplică local pe un model tridimensional de RhE compus din keratinocite ne-transformate derivate din epidermă umană care au fost cultivate pentru a forma un model multistratificat extrem de diferențiat de epidermă umană. Modelul este compus din straturi organizate (bazal, spinos și granular), precum și dintr-un strat cornos (stratum corneum) multistratificat care conține straturi lipidice lamelare intercelulare reprezentând principalele clase lipidice similare celor observate *in vivo*.

13. Iritația cutanată indusă de substanța chimică, manifestată, în principal, prin eritem și edem, este rezultatul unei cascade de evenimente care încep cu pătrunderea substanțelor chimice prin stratul cornos, unde acestea ar putea afecta straturile subiacente de keratinocite și alte celule din piele. Celulele deteriorate fie pot elibera mediatori inflamatori, fie pot induce o cascadă inflamatorie care acționează, de asemenea, asupra celulelor din dermă, în special asupra celulelor stromale și endoteliale din vasele de sânge. Dilatarea și permeabilitatea crescută a celulelor endoteliale sunt cele care produc eritemele și edemele observate (29). În special, metodele de testare bazate pe RhE, în absența vascularizării în sistemul de testare *in vitro*, măsoară evenimentele inițiatoare în cascadă, de exemplu lezarea celulei/țesutului (16) (17), folosind viabilitatea celulară drept citire.

14. Viabilitatea celulară la modelele RhE se măsoară prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1] într-o sare de formazan de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (31). Substanțele chimice iritante sunt identificate pe baza capacității acestora de a reduce viabilitatea celulară sub pragurile stabilite (și anume ≤ 50 % pentru substanțele din categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP). În funcție de cadrul de reglementare și aplicabilitatea metodei de testare, substanțele chimice pentru care viabilitatea celulară este superioară nivelului stabilit pot fi considerate non-iritante (și anume, > 50 %, nicio categorie).

▼M8

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

15. Înainte de utilizarea sistematică a oricăruia dintre modelele de testare validate care respectă prezenta metodă de testare (apendicele 2), laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice proprii prin utilizarea celor zece substanțe de verificare enumerate în tabelul 1. În situațiile în care, spre exemplu, o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (8)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1. Utilizarea unei substanțe de verificare alternative ar trebui să fie justificată.

16. În cadrul verificării performanței, se recomandă ca utilizatorii să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire, astfel cum sunt specificate de către producătorul modelului de RhE. Această etapă este în mod special importantă în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade de timp lungi. Odată ce o metodă de testare a fost stabilită cu succes, iar performanța acesteia în utilizare a fost dobândită și demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic o metodă de testare, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

Tabelul 1

Substanțe de verificare ([1])

martor	Nr. CAS	Punctaj *in vivo* ([2])	Stare fizică	Categoria din GHS al ONU
SUBSTANȚELE NECLASIFICATE (neîncadrate în GHS al ONU)				
Acid naftilacetic	86-87-3	0	Solid	Neîncadrat
izopropanol	67-63-0	0,3	Lichid	Neîncadrat
stearat de metil	112-61-8	1	Solid	Neîncadrat
butirat de heptil	5870-93-9	1,7	Lichid	Neîncadrat (*Cat. opțională 3*) ([3])
salicilat de hexil	6259-76-3	2	Lichid	Neîncadrat (*Cat. opțională 3*) ([3])
SUBSTANȚE CLASIFICATE (categoria 2 din GHS al ONU)				
ciclamenaldehidă	103-95-7	2,3	Lichid	Cat. 2
1-bromohexan	111-25-1	2,7	Lichid	Cat. 2
hidroxid de potasiu (5 % apă)	1310-58-3	3	Lichid	Cat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazină	5271-27-2	3,3	Solid	Cat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Lichid	Cat. 2

([1]) Substanțele de verificare constituie un subset de substanțe utilizate în studiul de validare, iar selecția se bazează pe următoarele criterii; (i) substanțele chimice sunt disponibile în comerț; (ii) sunt reprezentative pentru întreaga gamă de scoruri Draize de evaluare a efectelor iritante (de la substanțe neiritante până la substanțe puternic iritante); (iii) au o structură chimică bine definită; (iv) sunt reprezentative pentru funcționalitatea chimică utilizată în procesul de validare; (v) au furnizat rezultate reproductibile *in vitro* în cadrul mai multor teste și în mai multe laboratoare; (vi) au fost corect anticipate *in vitro* și (vii) nu sunt asociate unui profil extrem de toxic (de exemplu, cancerigen sau toxic pentru sistemul de reproducere) și nu sunt asociate unor costuri de eliminare prohibitive.

([2]) Punctarea *in vivo* în conformitate cu MT B.4 (4).

([3]) În cadrul acestei metode de testare, categoria 3 opțională (substanțe ușor iritante) din GSH al ONU (1) este considerată a fi „Nicio categorie”.

▼M8

PROCEDURA

17. În continuare este prezentată o descriere a componentelor și a procedurilor metodei de testare bazate pe RhE pentru evaluarea iritației cutanate (a se vedea, de asemenea, apendicele 3 pentru parametrii referitori la fiecare model de testare). Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru cele patru modele care respectă această metodă de testare (32) (33) (34) (35).

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE PE RHE

Condiții generale

18. Pentru reconstrucția epiteliului ar trebui utilizate keratinocite umane ne-transformate. Sub stratul cornos funcțional ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile (stratul bazal, stratul spinos, stratul granulos). Stratul cornos ar trebui să fie multistratificat și să prezinte profilul lipidic esențial pentru a constitui o barieră funcțională robustă care să reziste la penetrarea rapidă a substanțelor chimice citotoxice de referință, de exemplu dodecilsulfatul de sodiu (SDS) sau Triton X-100. Bariera funcțională ar trebui demonstrată și poate fi evaluată fie prin stabilirea concentrației la care substanța chimică de referință reduce viabilitatea țesuturilor cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere, fie prin stabilirea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă. Etanșeitatea modelului RhE ar trebui să prevină trecerea substanței dincolo de stratul cornos către țesutul viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelizare a expunerii pielii. Modelul RhE nu trebuie să fie contaminat cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Condiții funcționale

Viabilitate

19. Testul utilizat pentru cuantificarea viabilității este testul MTT (31). Celulele viabile ale structurii țesutului RhE pot reduce colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). Densitatea optică (DO) doar a solventului de extracție ar trebui să fie suficient de mică, și anume, DO < 0,1. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței (DO), fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (36). Utilizatorii modelului RhE ar trebui să se asigure că fiecare lot de model RhE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Producătorul/furnizorul modelului RhE stabilește un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ (în condițiile metodei de testare pentru iritația cutanată). Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele RhE validate incluse în prezenta metodă de testare sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat faptul că țesuturile tratate cu substanță martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători similare ale viabilității) în perioada de expunere prin testare.

Tabelul 2

Intervale de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorilor negativi pentru modelele de testare incluse în prezenta MT

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼**M8**

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funcția de barieră

20. Stratul cornos și compoziția lipidică a acestuia ar trebui să fie suficiente pentru a rezista la penetrarea rapidă a substanțelor chimice citotoxice de referință (de exemplu, SDS sau Triton X-100), astfel cum este estimat prin IC_{50} sau ET_{50} (tabelul 3).

Morfologie

21. Ar trebui să se prezinte examinarea histologică a modelului RhE prin demonstrarea unei structuri similare celei a epidermei umane (inclusiv stratul cornos multistratificat).

Reproductibilitate

22. Rezultatele martorilor pozitivi și negativi ai metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea în timp.

Controlul calității (CC)

23. Modelul RhE ar trebui să fie utilizat doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de modele RhE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai importante sunt criteriile privind *viabilitatea* (punctul 19), *funcția de barieră* (punctul 20) și *morfologia* (punctul 21). Datele respective ar trebui să fie furnizate utilizatorilor metodei de testare pentru ca aceștia să le poată include în raportul de testare. Producătorul/furnizorul modelului RhE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru IC_{50} sau ET_{50}. Numai rezultatele obținute pe baza unor țesuturi calificate pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a clasificării substanțelor iritante. Intervalele de acceptabilitate pentru cele patru modele de testare incluse în prezenta metodă de testare sunt indicate în tabelul 3.

Tabelul 3

Criterii privind controlul calității lotului pentru modelele de testare incluse în prezenta MT

	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiSkin™ (SM) (18 ore de tratament cu SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 8,7 ore
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 ore	ET_{50} = 10,0 ore
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 ore de tratament cu SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

24. Ar trebui să fie utilizate cel puțin trei duplicate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru martorii din cadrul fiecărui test. Atât în cazul substanțelor chimice lichide, cât și în cazul celor solide, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat pentru a acoperi uniform suprafața epidermei, evitându-se totodată o doză infinită, și anume, cu valori între 26 și 83 $\mu l/cm^2$ sau mg/cm^2 (a se vedea apendicele 3). În cazul substanțelor chimice solide, suprafața epidermei ar trebui să fie umezită cu apă deionizată sau distilată înainte de aplicare, pentru a îmbunătăți contactul dintre substanța chimică de testat și suprafața epidermei. În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Ar putea fi utilizată o plasă de nailon ca și mijloc de dispersie în unele cazuri (a se vedea apendicele 3). La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat ar trebui să fie spălată cu atenție de pe suprafața epidermei, utilizând o soluție-tampon apoasă sau NaCl de 0,9 %. În funcție de modelele de testare pe RhE utilizate, perioada de expunere, perioada de expunere poate varia între 15 și 60 de minute, iar temperatura de incubare între 20 și 37 °C. Aceste perioade de expunere și temperaturi sunt optimizate pentru fiecare metodă de testare pe RhE și reprezintă diferitele proprietăți intrinseci ale modelelor de testare (de exemplu, funcția de barieră) (a se vedea apendicele 3).

25. În cadrul fiecărui test ar trebui să se utilizeze concomitent un martor negativ (MN) și un martor pozitiv (MP) pentru a demonstra că viabilitatea (folosind MN), funcția de barieră și sensibilitatea rezultată a țesuturilor (folosind MP) se încadrează în intervalul de valori istorice acceptabile stabilit. Substanța MP sugerată este soluția apoasă de SDS de 5 %. Substanțele MN sugerate sunt apă sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS).

Măsurători ale viabilității celulare

26. Conform procedurii de testare, este esențial ca viabilitatea să nu fie măsurată imediat după expunerea la substanța chimică de testat, ci după o perioadă de incubare post-tratament suficient de lungă a țesuturilor clătite în mediu proaspăt. Această perioadă permite atât recuperarea în urma unor efecte citotoxice ușoare, cât și manifestarea efectelor citotoxice clare. O perioadă de incubare post-tratament de 42 de ore a fost considerată ca fiind optimă în timpul optimizării testului pentru două dintre modelele de testare bazate pe RhE care stau la baza prezentei metode de testare (11) (12) (13) (14) (15).

27. Testul MTT este o metodă cantitativă standardizată care ar trebui să fie utilizată pentru măsurarea viabilității celulare în cadrul prezentei metode de testare. Acesta este compatibil cu o arhitectură tridimensională a țesutului. Eșantionul de țesut este introdus în soluția MTT având o concentrație adecvată (de exemplu, 0,3-1 mg/mL) timp de 3 ore. Soluția MTT este transformată în formazan albastru de celulele viabile. Precipitatul de formazan albastru este apoi extras din țesut utilizând un solvent (de exemplu izopropanol, izopropanol acid) și concentrația de formazan se măsoară determinând DO la 570 nm folosind o bandă de filtrare de maximum ±30 nm, sau printr-o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctul 34) (36).

28. Proprietățile optice ale substanței chimice de testat sau acțiunea sa chimică asupra MTT (de exemplu, substanțele chimice pot împiedica sau inversa producerea culorii și, de asemenea, pot să cauzeze producerea acesteia) pot influența testul, determinând o falsă estimare a viabilității. Acest lucru se poate întâmpla atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este eliminată complet de pe piele prin clătire sau atunci când aceasta pătrunde în epidermă. Dacă o substanță chimică de testat acționează direct asupra MTT (de exemplu, un reductor al MTT), este colorată în mod natural sau se colorează în timpul tratării țesutului, ar trebui utilizați martori suplimentari

▼M8

pentru a detecta și a corecta interferența substanței chimice de testat prin tehnica de măsurare a viabilității (a se vedea punctele 29 și 33). O descriere detaliată a modului de corectare a reducerii directe a MTT și a interferențelor agenților de colorare este disponibilă în PSO pentru cele patru metode validate incluse în prezenta metodă de testare (32) (33) (34) (35).

29. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la o soluție de MTT proaspăt preparată. Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a țesuturilor RhE neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb substanța chimică de testat în mod similar țesuturilor viabile. Fiecare substanță chimică de testat care reduce MTT se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate care sunt supuse întregii proceduri de testare pentru a genera o reducere nespecifică a MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un singur martor NSMTT este suficient pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste/serii de teste independente efectuate. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT).

30. Pentru a identifica o posibilă interferență cauzată de substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care s-au colorat în contact cu apa sau cu izopropanolul și a decide dacă sunt necesare verificări suplimentare, ar trebui să se efectueze analiza spectrală a substanței chimice de testat în apă (mediu în timpul expunerii) și/sau izopropanol (soluție de extracție). În cazul în care substanța chimică de testat din apă și/sau izopropanol absoarbe lumina în intervalul de 570 ± 30 nm, ar trebui realizați martori coloranți suplimentari sau, în mod alternativ, ar trebui utilizată o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, iar în acest caz nu sunt necesari astfel de martori (a se vedea punctele 33 și 34). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat colorată care interferează este aplicată pe cel puțin două replicate de țesut viabile, acestea fiind supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate într-un mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}). Testul pentru martorul NSC_{living} trebuie efectuat concomitent cu testul substanței chimice de testat colorate și, în cazul testării multiple, trebuie efectuat un test pentru un martor independent NSC_{living} la fiecare test efectuat (în cadrul fiecărei secvențe de testare), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT, minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}).

31. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât o reducere directă a MTT (a se vedea punctul 29), cât și interferența culorii (a se vedea punctul 30) va necesita, de asemenea, un al treilea set de martori, în afară de NSMTT și martorii NSC_{living} descriși la punctele anterioare, la efectuarea măsurătorii standard a absorbanței (DO). Acest lucru este valabil, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat colorate în nuanțe închise care influențează testul MTT (de exemplu, culoarea albastră, violet, neagră),

▼M8

deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce direct MTT, conform descrierii de la punctul 29. Aceste substanțe chimice de testat se pot prinde atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte și, prin urmare, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării substanței chimice de testat la țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC_{living} corectează deja interferența culorii determinată de prinderea substanței chimice de testat de țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuat un test pentru un al treilea martor de culoare nespecifică la țesuturi moarte (NSC_{killed}). La acest martor suplimentar, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi duplicate moarte, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar se incubează în mediu în loc de MTT în etapa de incubare MTT. O singură verificare pentru martorul NSC_{killed} este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și, dacă este posibil, pe același lot de țesuturi. Viabilitatea țesutului real se calculează apoi ca fiind procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat % NSMTT minus $\%NSC_{living}$plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{killed}).

32. Este important de precizat că reducerea valorii MTT nespecifice și interferențele culorii nespecifice pot crește valorile de citire ale extractului de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, fiecare laborator ar trebui să stabilească intervalul de liniaritate al spectrofotometrului lor pentru formazan MTT (CAS # 57360-69-7) dintr-o sursă comercială înainte de a iniția testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare. Măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor direcți ai MTT și a substanțelor chimice care interferează cu culorile atunci când valorile DO ale extractelor de țesuturi, care sunt obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferența culorii, se află în intervalul liniar al spectrofotometrului sau atunci când procentul de viabilitate necorectat obținut cu substanța chimică de testat este deja $\leq$ 50 %. Cu toate acestea, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % $NSC_{living} \geq$ 50 % din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție, deoarece aceasta este valoarea-limită utilizată pentru a distinge substanțele chimice clasificate de cele neclasificate (a se vedea punctul 36).

33. Pentru substanțele chimice de testat colorate care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) din cauza unei interferențe prea puternice cu testul MTT, poate fi utilizată procedura de spectrofotometrie HPLC/UPLC alternativă pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctul 34) (36). Sistemul de spectrofotometrie HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică de testat înainte de cuantificarea sa (36). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Martorii NSMTT ar trebui să fie totuși utilizați în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce în mod direct MTT sau are o culoare care împiedică evaluarea capacității de a reduce MTT în mod direct (conform descrierii de la punctul 29). Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Pentru substanțele chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează ca procent de viabilitate tisulară obținut la țesuturi vii

▼M8

expuse la substanța chimică de testat, minus % NSMTT. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT, care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

34. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, de asemenea, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (36). Datorită diversității sistemelor de spectrofotometrie HPLC/UPLC, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (36) (37). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 4. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 4 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptabilitate

35. Pentru fiecare metodă de testare care utilizează loturi valabile de modele de RhE (a se vedea punctul 23), țesuturile tratate cu martor negativ ar trebui să prezinte o densitate optică care să reflecte calitatea țesuturilor care au parcurs etapele de transport și recepție, precum și toate procesele de protocol. Valorile densității optice (DO) ale martorilor nu ar trebui să fie sub limitele istorice stabilite. În mod similar, țesuturile tratate cu martor pozitiv, și anume, o soluție apoasă de 5 % SDS, ar trebui să reflecte capacitatea acestora de a reacționa la o substanță chimică iritantă în condițiile metodei de testare [a se vedea apendicele 3 și, pentru informații suplimentare, PSO-urile celor patru modele de testare incluse în prezenta orientare privind testarea (32) (33) (34) (35)]. Măsurile asociate și adecvate ale variabilității între țesuturile duplicate, și anume, abaterile standard (DS) ar trebui să se încadreze în limitele de acceptare stabilite pentru modelul de testare utilizat (a se vedea apendicele 3).

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

36. Valorile densității optice obținute pentru fiecare substanță chimică de testat pot fi utilizate pentru a calcula procentul de viabilitate normalizat la nivelul martorului negativ, care este stabilit la 100 %. În cazul în care se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. Valoarea-limită a procentului de viabilitate celulară pe baza căreia se face distincția între substanțele chimice de testat iritante și cele neclasificate, precum și procedura (procedurile) statistică (statistice) utilizată (utilizate) pentru evaluarea rezultatelor și identificarea substanțelor chimice iritante, ar trebui să fie clar definite și documentate și să se demonstreze caracterul adecvat al acestora (a se vedea PSO-urile modelelor de testare pentru informații). În continuare sunt prezentate valorile-limită pentru estimarea efectelor iritante:

▼M8

— Substanța chimică de testat este identificată ca necesitând clasificarea și etichetarea în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (categoria 2 sau 1) dacă procentul mediu al viabilității tisulare după expunere și după perioada de incubare post-tratament este mai mic de sau egal cu (≤) 50 %. Întrucât modelele de testare bazate pe RhE care fac obiectul prezentei metode de testare nu pot stabili încadrarea în categoriile 1 și 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP, vor fi necesare informații suplimentare privind coroziunea cutanată, pentru a decide cu privire la clasificarea sa finală [a se vedea, de asemenea, documentul de orientare al OCDE privind IATA (3)]. În cazul în care se constată că substanța chimică de testat este necorozivă (de exemplu, pe baza MT.40, B.40bis sau B.65) și că aceasta prezintă o viabilitate a țesutului după expunere și după perioada de incubare post-tratament mai mică de sau egală cu (≤) 50 %, substanța chimică de testat este considerată a fi iritantă pentru piele în conformitate cu categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

— În funcție de cadrul de reglementare din statele membre, substanța chimică de testat poate fi considerată ca fiind neiritantă pentru piele în conformitate cu clasificarea „neîncadrat” din GHS al ONU/Regulamentul CLP dacă viabilitatea tisulară după expunere și după perioada de incubare post-tratament este mai mare (>) de 50 %.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

37. Pentru fiecare serie, ar trebui să se consemneze într-un tabel date obținute pentru fiecare țesut duplicat (de exemplu, valorile DO și datele privind procentele calculate ale viabilității celulare pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea corespunzătoare), inclusiv datele obținute în urma repetării experimentelor, dacă este cazul. În plus, ar trebui să se consemneze valorile medii ± DS pentru fiecare serie. Interacțiunile observate cu reactivul MTT și cu substanțele chimice de testat colorate ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică testată.

Raport testului

38. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat și substanțele chimice martor:

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/substanțelor chimice martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Modelul și protocolul RhE utilizate (precum și justificarea alegerii, dacă este cazul)

▼**M8**

Condiții de testare:

— Modelul RhE utilizat (inclusiv numărul lotului);

— Informațiile privind calibrarea pentru dispozitivul de măsurare (de exemplu, spectrofotometru), lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de linearitate al dispozitivului de măsurare; Descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— Descrierea calificării sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC, dacă este cazul; informații de asistență complete privind modelul de RhE utilizat, inclusiv performanța acestuia. Acestea ar trebui să includă, printre altele:

i) viabilitatea;

ii) funcția de barieră;

iii) morfologia;

iv) reproductibilitate și predictibilitate

v) controalele calității (CC) asupra modelului;

— trimiteri la datele istorice ale modelului. Acestea ar trebui să includă, printre altele, acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul.

— Demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor de verificare.

Procedura de testare:

— detalii privind procedura de testare utilizată (inclusiv procedurile de spălare utilizate după perioada de expunere); doza de substanță chimică de testat și de martori utilizați;

— Durata și temperatura expunerii și perioada de incubație post-expunere;

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de țesuturi duplicate utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (MP, martor negativ și NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul);

— descrierea criteriilor de decizie/a modelului predictiv aplicat pe baza modelului RhE utilizat;

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare (inclusiv procedurile de spălare).

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice; variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

▼**M8**

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru substanța chimică de testat.

Rezultate:

— prezentarea tabelară a datelor pentru fiecare substanță chimică de testat pentru fiecare test și fiecare măsurătoare duplicată care include valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară și valorile DS;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice de colorare, inclusiv valorile de vârf ale DO sau ale formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, valorile DS, procentul final corect de viabilitate tisulară;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și martorii în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS), a doua ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Declarație privind „Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC31), 9 aprilie 2009. Publicație disponibilă la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 203), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(5) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Rezistența electrică transcutanată (RET).

(6) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită (RHE).

(7) Capitolul B.65 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin barieră cu membrană.

▼**M8**

(8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 220). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. și Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. și Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. și Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. și Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. și Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. și Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. și Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. și Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. și Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, emisă de către Comitetul Consultativ Ştiinţific ECVAM (ESAC26), 27 aprilie 2007. Publicaţie disponibilă la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Acestea sunt standardele de performanţă iniţiale utilizate pentru validarea a două metode de testare. Aceste standarde de performanţă nu ar trebui să mai fie utilizate, întrucât există acum o versiune actualizată (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, emisă de către Comitetul Consultativ Ştiinţific ECVAM (ESAC29), 5 noiembrie 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (nr. 137), Organizaţia pentru Cooperare şi Dezvoltare Economică, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. şi Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. şi Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 159), Organizaţia pentru Cooperare şi Dezvoltare Economică, Paris.

(27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 155), Organizaţia pentru Cooperare şi Dezvoltare Economică, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. şi Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. şi Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (februarie 2009). SOP, versiunea 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (revizuire în martie 2009). SOP, versiunea 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (iunie 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, versiunea 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model „LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M. şi McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. şi Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, în: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Aceasta este versiunea actuală a standardelor de performanță ale ECVAM, actualizată în 2009 în vederea implementării GHS al ONU. Aceste standarde de performanță nu ar trebui să mai fie utilizate, întrucât există acum o versiune actualizată (8) referitoare la actuala orientare privind testarea.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, emisă de către Comitetul Consultativ Științific ECVAM (ESAC31), 8 iulie 2009.

(41) CE (2001). Directiva 2001/59/CE a Comisiei din 6 august 2001 de efectuare a celei de-a douăzeci şi opta adaptări la progresul tehnic a Directivei 67/548/CEE a Consiliului privind apropierea actelor cu putere de lege şi a actelor administrative referitoare la clasificarea, ambalarea şi etichetarea substanțelor periculoase, Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L225, 1-333.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIțII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (9).

Viabilitate celulară: Parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare, de exemplu, capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale celulare de a reduce colorantul vital MTT [bromură de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu, albastru de tiazolil], care, în funcție de efectul măsurat și de tipul testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Substanță chimică: înseamnă o substanță sau un amestec.

Concordanță: Acesta este un indicator al performanței pentru modelele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe” și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (9).

ET_{50}: Poate fi estimat prin calcularea perioadei de expunere necesare pentru a reduce viabilitatea celulară cu 50 % odată cu aplicarea substanței chimice de referință cu o concentrație specifică fixă, a se vedea, de asemenea, IC_{50}.

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

HPLC: Cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare

IC_{50}: Poate fi estimat prin determinarea concentrației la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % (IC_{50}) după o perioadă fixă de expunere (a se vedea, de asemenea, ET_{50}).

Doză infinită: Cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe epidermă, care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epidermei.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NSC_{killed}: Culoare nespecifică la țesuturi moarte.

NSC_{living}: Culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

Standarde de performanță (SP): Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin metoda de testare propusă la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (9).

MP: Martor pozitiv, un duplicat care conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratat cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (9).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (9).

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test utilizat în mod sistematic și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost conceput pentru a asigura o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat pentru toate situațiile de testare posibile și toate substanțele chimice (9).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un MP.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active de testat clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

▼**M8**

Iritația cutanată *in vivo*: Producerea de leziuni reversibile ale pielii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la 4 ore. Iritația cutanată este o reacție locală produsă la nivelul țesutului cutanat afectat, care apare la scurt timp după stimulare (38). Aceasta este cauzată de o reacție inflamatorie locală care implică sistemul imunitar (nespecific) înnăscut al țesutului cutanat. Principala sa caracteristică este procesul reversibil care implică reacții inflamatorii și majoritatea semnelor clinice caracteristice iritației (eritem, edem, prurit și durere) asociate unui proces inflamator.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice de testat negative/inactive clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼**M8**

Apendicele 2

MODELELE DE TESTARE INCLUSE ÎN PREZENTA METODĂ DE TESTARE

Nr.	Denumirea modelelor de testare	Tip de studiu de validare	Referințe
1	EpiSkin™	Studiu de validare prospectiv complet (2003-2007). Componentele acestui model au fost utilizate pentru a defini componentele metodei de testare esențiale din versiunea inițială și cea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (39) (40) (21) (*) . Mai mult, datele metodei cu privire la identificarea substanțelor neclasificate și a celor clasificate au constituit baza principală pentru definirea valorilor de specificitate și de sensibilitate ale standardelor de performanță inițiale (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*inițial*): Inițial, modelul de testare a fost supus unei validări prospective complete împreună cu versiunea nr. 1 din perioada 2003-2007. Componentele acestui model au fost utilizate pentru a defini componentele metodelor de testare esențiale din versiunea inițială și cea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** O modificare a versiunii inițiale a EpiDerm™ a fost validată pe baza SP inițiale ECVAM (21) în 2008 (*)	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Studiu de validare pe baza standardelor de performanță inițiale ale ECVAM (21) în 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Studiu de validare (2011-2012) pe baza standardelor de performanță (SP) din orientarea nr. 439 a OCDE privind testarea (8), care se bazează pe versiunea actualizată a standardelor de performanță ECVAM (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) și SP ale prezentei orientări privind testarea (8) (*)

(*) Standardele de performanță inițiale ECVAM (SP) (21) au fost dezvoltate în 2007 la finalizarea studiului de validare prospectivă (16) care evaluase performanța modelelor de testare nr. 1 și 2 în ceea ce privește sistemul de clasificare descris în a 28-a modificare a Directivei UE privind substanțele periculoase (41). În 2008, au fost introduse GHS al ONU (1) și Regulamentul CLP al UE, modificând în mod eficace valoarea-limită pentru diferențierea substanțelor neclasificate de cele clasificate de la un punctaj *in vivo* de 2,0 la 2,3. Pentru a se adapta la această cerință de reglementare modificată, valorile de precizie și lista substanțelor chimice de referință din SP ECVAM au fost actualizate în 2009 (2) (39) (40). Asemenea SP inițiale, SP actualizate au fost, de asemenea, bazate, în mare parte, pe date din modelele 1 și 2 (16), însă au utilizat, în plus, date privind substanțele chimice de referință de la modelul nr. 3. În 2010, versiunea actualizată a SP ECVAM a fost utilizată pentru a stabili SP aferente acestei orientări privind testarea (8). În sensul prezentei metode de testare, EpiSkin™ este considerată a fi MRV, datorită faptului că a fost utilizată pentru a elabora toate criteriile SP. Informații detaliate privind studiile de validare, o compilație a datelor generate, precum și informații generale cu privire la adaptările necesare ale SP ca urmare a punerii în aplicare a GHS al ONU/CLP, se găsesc în documentul de referință explicativ ECVAM/BfR la orientarea OCDE nr. 439 aferentă privind testarea (23).

SIT: Test de iritație cutanată

RHE: Epidermă umană reconstruită

▼**M8**

Apendicele 3

PARAMETRII PROTOCOLULUI SPECIFICI FIECĂRUI MODEL DE TESTARE INCLUS ÎN ACEASTĂ METODĂ DE TESTARE

Modelele bazate pe RhE prezintă protocoale foarte asemănătoare și, în special, toate utilizează o perioadă de post-incubație de 42 de ore (32) (33) (34) (35). Variațiile se referă, în principal, la trei parametri privind diferitele funcții de barieră ale modelelor de testare, care sunt enumerați aici: A) timpul și volumul de pre-incubare, B) aplicarea substanțelor chimice de testat și C) volumul de post-incubare.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Pre-incubarea				
Timpul de incubare	18-24 de ore	18-24 de ore	< 2 ore	15-30 de ore
Volum mediu	2 ml	0,9 ml	0,3 sau 1 ml	0,5 ml
B) Aplicarea substanței chimice de testat				
Pentru lichide	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Pentru substanțe solide	10 mg (26 mg/cm^2) + DW (5 µl)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16mg (32mg/cm^2) + DW (10 µl)	25mg (83mg/cm^2) + DW (25 µl)
Utilizarea unei plase din nailon	Nu este utilizată	Dacă este necesar	Aplicată	Nu este utilizată
Timpul total de aplicare	15 minute	60 minute	42 minute	15 minute
Temperatura de aplicare	Temperatura camerei (TC)	a) la TC timp de 25 de minute b) la 37 °C timp de 35 de minute	Temperatura camerei (TC)	Temperatura camerei (TC)
C) Volum post-incubare				
Volum mediu	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilitatea maximă acceptabilă				
Abaterea standard între țesuturile duplicate	AS18	AS18	AS18	AS18

TC: Temperatura camerei
AD: apă distilată
DPBS: Soluția-tampon fosfat salin a lui Dulbecco

▼**M8**

Apendicele 4

PARAMETRII CHEIE ȘI CRITERIILE DE ACCEPTARE PENTRU CALIFICAREA UNUI SISTEM DE SPECTROMETRIE HPLC/UPLC PENTRU MĂSURAREA FORMAZANULUI MTT EXTRAS DIN ȚESUTUL RHE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (36) (37)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, probă vie (extras de izopropanol din țesuturi RhE vii fără tratament), probă moartă (extras de izopropanol din țesuturile RhE moarte fără tratament)	$Zonă_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$ ([1])
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ efectul de matrice % ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard ULOQ ([2])	$Zona_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3:: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de la stocare la o temperatură specifică (de exemplu, 4 °C, -20 °C, -80 °C)	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită a fi de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi, și anume 200 µg/ml.

▼M7

B.47. METODA DE TESTARE A OPACITĂȚII ȘI PERMEABILITĂȚII CORNEENE LA BOVINE PENTRU IDENTIFICAREA I) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PRODUC LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A II) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 437 (2013). Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine (BCOP) a fost evaluată de Comitetul de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM), în colaborare cu Centrul european pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) și Centrul Japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) în anii 2006 și 2010 (1) (2). În cadrul primei evaluări, metoda de testare BCOP a fost evaluată pentru utilitatea acesteia la identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziuni oculare grave (1). În cadrul celei de a doua evaluări, metoda de testare BCOP a fost evaluată pentru utilitatea acesteia la identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritarea oculară sau lezarea oculară gravă (2). Baza de date de validare BCOP a fost constituită din 113 substanțe și 100 de amestecuri în total (2) (3). În urma acestor evaluări și a revizuirii lor inter pares s-a concluzionat faptul că metoda de testare poate identifica în mod corect substanțele chimice (atât substanțe, cât și amestecuri) care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1), precum și substanțele care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, astfel cum este definit de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (4) și de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]) și, prin urmare, a fost declarată valabilă din punct de vedere științific pentru ambele scopuri. Lezarea oculară gravă reprezintă producerea de leziuni tisulare la ochi sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Substanțele chimice de testat care provoacă leziuni oculare grave sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU. Substanțele chimice care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritația oculară sau lezarea oculară gravă sunt definite ca fiind cele care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificarea în categoria 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU, și anume, cele menționate în „nicio categorie” din GHS al ONU. Prezenta metodă de testare include utilizarea și limitele recomandate pentru metoda de testare BCOP pe baza evaluărilor acesteia. Principalele diferențe dintre versiunea originală din anul 2009 și versiunea actualizată din anul 2013 ale Orientării OCDE privind testarea includ, dar nu sunt limitate la: utilizarea metodei de testare BCOP pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare conform GHS al ONU (punctele 2 și 7); clasificările aplicabilității metodei de testare BCOP la testarea alcoolilor, cetonelor și substanțelor solide (punctele 6 și 7) și a substanțelor și a amestecurilor (punctul 8); clasificări ale modalităților de testare a substanțelor tensioactive sau a amestecurilor care conțin surfactanți (punctul 28); actualizări și clarificări cu privire la martorii pozitivi (punctele 39 și 40); o actualizare a criteriilor de decizie ale metodei de testare BCOP (punctul 47); o actualizare a criteriilor de acceptare a studiului (punctul 48); o actualizare a elementelor raportului de testare (punctul 49); o actualizarea a apendicelui 1 cu privire la definiții; adăugarea apendicelui 2 pentru capacitatea predictivă a metodei de testare BCOP în diferite sisteme de clasificare; o actualizarea a apendicelui 3 cu privire la lista substanțelor chimice de verificare; și o actualizare a apendicelui 4 cu privire la suportul cornean BCOP (punctul 1) și opacimetru (punctele 2 și 3).

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

▼M7

În prezent, este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va putea înlocui testul ocular *in vivo* Draize pentru efectuarea de predicții în cadrul întregii game de iritații pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) ar putea înlocui testul ocular Draize (5). Abordarea descendentă (5) este concepută pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are potențial iritant ridicat, în timp ce abordarea ascendentă (5) este concepută pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu cauzează iritație oculară suficientă pentru a necesita o clasificare. Metoda de testare BCOP este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu limitări specifice, pentru clasificarea pericolelor la nivel ocular și pentru etichetarea substanțelor chimice. Cu toate că nu este considerată valabilă ca metodă de testare de sine stătătoare de substituire a testului *in vivo* pe ochi de iepure, metoda de testare BCOP este recomandată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare precum abordarea descendentă propusă de către Scott *et al.* (5) pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume substanțele chimice care urmează să fie clasificate în categoria 1 din GHS al ONU fără testare suplimentară (4). Metoda de testare BCOP este recomandată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară sau lezarea oculară gravă, astfel cum este definit de GHS al ONU („nicio categorie” din GHS al ONU) (4) în cadrul unei strategii de testare precum abordarea ascendentă (5). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu se preconizează să cauzeze lezare oculară gravă sau care nu este clasificată pentru iritație oculară/lezare oculară gravă prin metoda de testare BCOP ar necesita teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a se stabili o clasificare definitivă.

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul pericolelor la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a provoca opacitate sau permeabilitate crescută a unei cornee izolate de bovină. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin: (i) scăderea transmisiei luminii (opacitate) și (ii) creșterea pătrunderii colorantului fluoresceină sodică (permeabilitate). Evaluarea opacității și permeabilității corneei după expunerea la o substanță chimică de testat se combină pentru a deduce un scor privind iritarea *in vitro* (IVIS) care se utilizează pentru clasificarea nivelului de iritabilitate a substanței chimice de testat.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul metodei de testare BCOP al ICCVAM (6) (7) care a fost dezvoltat inițial din informații obținute din protocolul Institutului pentru științe *in vitro*- IIVS) și Protocolul 124 al INVITTOX (8). Acestea din urmă reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de prevalidare sponsorizat de Comunitatea Europeană și efectuat în perioada 1997-1998. Cele două protocoale se bazează pe metoda de testare BCOP raportată pentru prima dată de către Gautheron *et al.* (9).

Metoda de testare BCOP poate fi utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoca leziuni oculare grave, astfel cum sunt definite de GHS al ONU, și anume substanțele chimice clasificate în categoria 1 din GHS al ONU (4). Atunci când este utilizată în acest scop, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 79 % (150/191), o rată de rezultate fals pozitive de 25 % (32/126) și o rată de rezultate fals negative de 14 % (9/65) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU (3) (a se vedea apendicele 2 tabelul 1). Atunci când substanțele chimice de testat din cadrul anumitor clase de substanțe chimice (și anume, alcooli, cetone) sau fizice (și anume, substanțe solide) sunt excluse din baza de date, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 85 % (111/131), o rată de rezultate fals pozitive de 20 % (16/81) și o rată de rezultate fals negative de 8 % (4/50) în ceea ce privește sistemul de clasificare GHS al ONU (3). Eventualele

▼M7

deficiențe ale metodei de testare BCOP atunci când este utilizată pentru a identifica substanțe chimice care provoca leziuni oculare grave (categoria 1 din GHS al ONU) se datorează ratei ridicate de rezultate fals pozitive pentru alcooli și cetone și ratei ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide observate în baza de date de validare (1) (2) (3). Cu toate acestea, având în vedere faptul că nu toți alcoolii și cetonele sunt supraestimați prin metoda de testare BCOP și unii sunt corect preconizați drept categoria 1 din GHS al ONU, aceste două grupe funcționale organice nu sunt considerate a fi în afara domeniului de aplicabilitate a metodei de testare. Revine utilizatorului acestei metode de testare să decidă dacă o posibilă supraestimare a unui alcool sau a unei cetone poate fi acceptată sau este necesară efectuarea de teste suplimentare într-o abordare pe baza forței probante. În ceea ce privește ratele de rezultate fals negative pentru substanțele solide, se remarcă faptul că substanțele solide pot conduce la condiții de expunere variabile și extreme în testul Draize de iritație oculară *in vivo*, care pot rezulta în predicții irelevante ale adevăratului lor potențial iritant (10). De asemenea, se remarcă faptul că niciunul dintre rezultatele fals negative identificate în baza de date de validare ICCVAM (2) (3), în contextul identificării substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), nu au condus la o valoare a IVIS $\leq$ 3, care este criteriul utilizat pentru a identifica o substanță chimică de testat ca încadrându-se în „nicio categorie” din GHS al ONU. În plus, rezultatele fals negative ale BCOP nu sunt critice în acest context, având în vedere faptul că toate substanțele chimice care produc o valoare 3< IVIS$\leq$ 55 ar fi testate ulterior în cadrul altor teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau, ca o ultimă opțiune, la iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențiale cu o abordare pe baza forței probante. Având în vedere faptul că unele substanțe chimice solide sunt corect estimate prin metoda de testare BCOP în categoria 1 din GHS al ONU, această stare fizică nu este considerată, de asemenea, a fi încadrată în afara domeniului de aplicabilitate a metodei de testare. Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care o valoare a IVIS $\geq$ 55 se acceptă ca indicator al unui răspuns care provocă lezarea oculară gravă ce trebuie clasificată în categoria 1 din GHS al ONU fără testări suplimentare. Cu toate acestea, astfel cum s-a menționat deja, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor sau cetonelor se interpretează cu prudență având în vedere potențialul de supraestimare.

Metoda de testare BCOP pot fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțe chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă în temeiul sistemului de clasificare GHS al ONU (4). Atunci când este utilizată în acest scop, metoda de testare BCOP are o precizie generală de 69 % (135/196), o rată de rezultate fals pozitive de 69 % (61/89) și o rată de rezultate fals negative de 0 % (0/107) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU (3) (a se vedea apendicele 2 tabelul 2). Rata de rezultate fals pozitive obținută [substanțele chimice din „nicio categorie” a GHS al ONU care produc o valoare a IVIS >3 *in vivo*, a se vedea punctul 47) este în mod considerabil ridicată, dar nu critică în acest context, având în vedere faptul că toate substanțele chimice care produc o valoare 3< IVIS$\leq$ 55 ar fi testate ulterior în cadrul altor teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau ca o ultimă opțiune, pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, cu ajutorul unei strategii de testare secvențiale cu o abordare pe baza forței probante a datelor. Metoda de testare nu prezintă deficiențe specifice în ceea ce privește testarea alcoolilor, cetonelor și substanțelor solide atunci când scopul este identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („nicio categorie” a GHS al ONU) (3). Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat negativ (IVIS $\leq$ 3) se acceptă drept indicator al faptului că nu este necesară clasificarea („nicio categorie” a GHS al ONU). Întrucât metoda de testare BCOP nu poate identifica în mod corect decât 31 % din substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, această metodă de testare nu trebuie să fie considerată prima opțiune pentru a iniția o abordare ascendentă (5) în cazul în care sunt disponibile alte metode *in vitro* validate și acceptate cu același grad ridicat de sensibilitate, dar un grad mai ridicat de specificitate.

▼M7

Baza de date de validare BCOP a fost constituită din 113 substanțe și 100 de amestecuri în total (2) (3). Metoda de testare BCOP este considerată, prin urmare, ca fiind aplicabilă pentru testarea atât a substanțelor, cât și a amestecurilor.

Metoda de testare BCOP nu este recomandată pentru identificarea substanțelor chimice de testat care sunt clasificate drept iritante la nivel ocular (categoria 2 din GHS al ONU sau categoria 2A) sau substanțele chimice de testat care sunt clasificate drept ușor iritante la nivel ocular (categoria 2B din GHS al ONU), având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU clasificate insuficient drept categoria 2, 2A sau 2B și substanțe chimice din categoria „nicio categorie” din GHS al ONU clasificate excesiv drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU (2) (3). În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

Toate procedurile care utilizează ochi și cornee de bovine trebuie să respecte reglementările și procedurile aplicabile ale instalației de testare cu privire la manipularea materialelor de origine animală, care includ țesuturile și fluidele tisulare, fără a se limita la acestea. Se recomandă măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (11).

Cu toate că metoda de testare BCOP nu ia în considerare leziunile conjunctivale și iridiane, aceasta abordează efectele asupra corneei, care sunt principalul motor de clasificare *in vivo* atunci când se ia în considerare clasificarea GHS al ONU. Reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare BCOP. Pe baza studiilor pe ochi de iepure, s-a propus posibila utilizare a unei evaluări a adâncimii inițiale a leziunii corneene pentru a identifica unele tipuri de efecte ireversibile (12). Cu toate acestea, sunt necesare cunoștințe științifice suplimentare pentru a înțelege modul în care se produc efectele ireversibile care nu sunt legate de leziunea inițială de nivel ridicat. În sfârșit, metoda de testare BCOP nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.

Această metodă de testare va fi actualizată periodic, pe măsură ce se iau în considerare noi informații și date. De exemplu, histopatologia ar putea fi utilă atunci când este necesară o caracterizare mai cuprinzătoare a leziunilor corneene. Astfel cum este subliniat în documentul de orientare nr. 160 al OCDE (13), utilizatorii sunt încurajați să păstreze corneele și să pregătească specimenele histopatologice care pot fi utilizate pentru a dezvolta o bază de date și criterii de decizie care pot îmbunătăți în continuare acuratețea acestei metode de testare.

Orice laborator care utilizează pentru prima dată această metodă de testare trebuie să utilizeze substanțele chimice de verificare prevăzute în apendicele 3. Un laborator poate utiliza respectivele substanțe chimice pentru a-și demonstra performanțele tehnice în ceea ce privește aplicarea metodei de testare BCOP, înainte de trimiterea datelor metodei de testare BCOP în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare BCOP este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a funcțiilor fiziologice și biochimice normale ale corneei bovine *in vitro*. În cadrul acestei metode de testare, leziunea provocată de substanța chimică de testat este evaluată prin măsurătorile cantitative ale modificărilor opacității și permeabilității corneene cu ajutorul unui opacimetru și, respectiv, al unui spectrofotometru în lumină vizibilă. Ambele măsurători sunt utilizate pentru a calcula un IVIS, care este utilizat pentru a desemna o categorie de clasificare a pericolelor *in vitro* pentru anticiparea potențialului iritant la nivel ocular *in vivo* al unei substanțe chimice de testat (a se vedea criteriile de decizie la punctul 48).

Metoda de testare BCOP utilizează cornee izolate de la ochii bovinelor proaspăt sacrificate. Opacitatea corneană este determinată cantitativ prin măsurarea transmisiei luminii prin cornee. Permeabilitatea este determinată cantitativ prin măsurarea cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate întreaga grosime a corneei, detectat în centrul camerei posterioare. Substanțele chimice de

▼M7

test sunt aplicate la nivelul suprafeței epiteliale a corneei prin adăugare în camera anterioară a suportului cornean. Apendicele 4 prezintă o descriere și o diagramă a unui suport cornean utilizat în metoda de testare BCOP. Suporturile corneene pot fi obținute comercial, din diferite surse sau pot fi confecționate.

Sursa și vârsta ochilor bovini și selectarea speciilor de animale

Bovinele trimise la abator sunt sacrificate în mod obișnuit pentru consumul uman sau în alte scopuri comerciale. Numai animalele sănătoase, considerate corespunzătoare pentru alimentația umană, sunt utilizate ca sursă de cornee pentru metoda de testare BCOP. Deoarece bovinele au o greutate care variază în limite largi în funcție de rasă, vârstă și sex, nu există o greutate recomandată pentru animale în momentul sacrificării.

Utilizarea ochilor de la animale de vârste diferite poate conduce la variații ale dimensiunilor corneene. Corneele cu un diametru orizontal > 30,5 mm și valori ale grosimii corneene centrale (CCT) ≥1100 μm sunt obținute, în general, de la bovine cu vârsta de peste opt ani, în timp ce corneele cu diametrul orizontal < 28,5 mm și CCT < 900 μm sunt obținute, în general, de la bovine cu vârsta sub cinci ani (14). Din această cauză, nu se utilizează de regulă ochi de la animale cu vârsta de peste 60 de luni. În mod obișnuit, nu au fost utilizați ochi de la bovine cu vârsta sub 12 luni deoarece acestea sunt în creștere, iar grosimea și diametrul corneei sunt în mod considerabil mai mici decât cele raportate pentru ochii proveniți de la bovine mature. Cu toate acestea, utilizarea corneelor de la animale tinere (și anume, cele cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 luni) este permisă deoarece aceasta prezintă o serie de avantaje precum disponibilitatea sporită, un interval de vârstă mai limitat și riscuri diminuate în ceea ce privește expunerea potențială a lucrătorilor la encefalopatia bovină spongiformă (15). Având în vedere faptul că evaluarea suplimentară a efectului dimensiunii sau grosimii corneei asupra sensibilității la substanțe chimice corozive sau iritante ar fi utilă, utilizatorii sunt încurajați să raporteze vârsta estimativă și/sau greutatea animalelor de la care provin corneele utilizate într-un studiu.

Colectarea și transportul ochilor la laborator

Ochii se colectează de către angajații abatorului. Pentru a reduce la minim lezarea mecanică sau de altă natură a ochilor, aceștia se enuclează cât mai curând posibil după sacrificare și se păstrează la rece imediat după enucleere și în timpul transportului. Pentru a preveni expunerea ochilor la substanțe chimice cu potențial iritant, angajații abatorului nu trebuie să utilizeze detergenți la spălarea capului animalului.

Ochii se imersează complet în soluție salină echilibrată Hanks rece (HBSS), într-un recipient cu dimensiuni adecvate și se transportă la laborator într-un mod care să reducă la minim deteriorarea și/sau contaminarea bacteriană. Întrucât ochii sunt colectați în timpul procesului de sacrificare, aceștia ar putea fi expuși la sânge sau la alte substanțe biologice, inclusiv bacterii și alte microorganisme. Prin urmare, este important să se asigure reducerea la minim a riscului de contaminare [de exemplu, prin păstrarea în gheață a recipientului care conține ochii și prin adăugarea de antibiotice la HBSS utilizată la păstrarea ochilor în timpul transportului (de exemplu, penicilină în concentrație de 100 UI/ml și streptomicină, 100 μg/ml)].

Perioada de timp dintre colectarea ochilor și utilizarea corneelor în metoda de testare BCOP se reduce la minim (în mod normal, acestea se colectează și se utilizează în aceeași zi) și trebuie să se demonstreze că aceasta nu compromite rezultatele testării. Rezultatele au la bază criteriile de selecție a ochilor, precum și răspunsurile probelor martor pozitive și negative. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să provină din același grup de ochi colectați într-o anumită zi.

Criteriile de selecție a ochilor utilizați în metoda de testare BCOP

Ochii, odată ajunși la laborator, se examinează cu atenție pentru defecte, inclusiv opacitate crescută, zgârieturi și neovascularizare. Numai corneele care provin de la ochi lipsiți de asemenea defecte urmează să fie utilizate.

▼M7

De asemenea, calitatea fiecărei cornee este evaluată în etape ulterioare ale analizei. Corneele care au o capacitate mai mare de șapte unități de opacitate sau echivalentă pentru opacimetru și suporturile corneene, utilizate după o perioadă de echilibrare inițială de o oră, se îndepărtează (NOTĂ: opacimetrul se calibrează cu standarde de opacitate care sunt utilizate pentru stabilirea unităților de opacitate, a se vedea apendicele 4).

Fiecare grup de tratament (substanță chimic de testat, martori pozitivi și negativi testați în paralel) constă în minim trei ochi. În metoda de testare BCOP se utilizează trei cornee în calitate de cornee martor negativ. Având în vedere faptul că toate corneele se excizează din globul integral și se montează în camerele corneene, există posibilitatea producerii de artefacte din cauza manipulării în ceea ce privește valorile opacității corneene individuale și ale permeabilității (inclusiv martorul negativ). În plus, valorile opacității și permeabilității pentru corneele martor negative sunt utilizate pentru a corecta valorile permeabilității și opacității corneene ale substanței chimice de testat tratate și cele ale martorului pozitiv tratat în calculele IVIS.

PROCEDURĂ

Pregătirea ochilor

Corneele fără defecte sunt disecate cu menținerea unei margini de 2 până la 3 mm de sclerotică pentru a contribui la manipularea ulterioară, luându-se precauții pentru a preveni lezarea epiteliului și a endoteliului corneei. Corneele izolate sunt montate în suporturi corneene special proiectate care sunt compuse din compartimente anterioare și posterioare strâns legate de partea epitelială și, respectiv, de partea endotelială a corneei. Ambele camere sunt umplute cu un exces de mediu Eagle esențial minimal (EMEM) fără roșu fenol, preîncălzit (mai întâi camera posterioară), asigurându-se că nu se formează bule. Dispozitivul este apoi echilibrat la 32 ± 1 °C timp de cel puțin o oră, pentru a permite corneelor să se echilibreze cu mediul și, în măsura în care este posibil, să desfășoare o activitate metabolică normală (temperatura aproximativă a suprafeței corneene *in vivo* este de 32 °C).

După perioada de echilibrare, în ambele camere se adaugă EMEM fără roșu fenol proaspăt preîncălzit și se efectuează citirile nivelului de bază pentru opacitatea fiecărei cornee. Toate corneele care prezintă leziuni tisulare macroscopice (de exemplu, zgârieturi, pigmentare, neovascularizare) sau o opacitate mai mare decât șapte unități de opacitate sau echivalentă pentru opacimetru și suporturile cornene se îndepărtează. Se selectează cel puțin trei cornee drept cornee martor negativ (sau solvent). Corneele rămase sunt distribuite apoi în grupuri de tratament și grupuri martor pozitiv.

Deoarece căldura specifică a apei este mai mare decât cea a aerului, apa asigură condiții de temperatură pentru incubație mai stabile. Prin urmare, se recomandă utilizarea unei băi de apă pentru menținerea suportului cornean și a conținutului acestuia la temperatura de 32 ± 1 °C. Cu toate acestea, se pot utiliza, de asemenea, incubatoare cu aer, dacă se iau precauții pentru menținerea stabilității temperaturii (de exemplu, prin preîncălzirea suporturilor și a mediilor).

Aplicarea substanței chimice de testat

Se utilizează două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțele lichide și surfactanți (solizi sau lichizi) și altul pentru substanțe solide nesurfactante.

Substanțele lichide sunt testate în stare nediluată. În mod normal, substanțele semisolide, cremele și cerurile sunt testate în același mod ca și substanțele lichide. Substanțele surfactante pure sunt testate la o concentrație de 10 % g/v într-o soluție de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. Pentru utilizarea de concentrații de diluție alternative este necesară furnizarea

▼M7

unei justificări adecvate. Amestecurile care conţin surfactanţi se pot testa nediluate sau diluate la o concentraţie corespunzătoare, în funcţie de scenariul de expunere *in vivo* corespunzător. Pentru concentraţia testată este necesară o justificare adecvată. Corneele se expun la substanţele lichide şi la surfactanţi timp de 10 minute. Utilizarea altor durate de expunere trebuie însoţită de o justificare ştiinţifică adecvată. A se vedea apendicele 1 pentru o definiţie a surfactantului şi a amestecului care conţine surfactant.

În mod normal, substanţele solide nesurfactante sunt testate sub formă de soluţii sau suspensii cu o concentraţie de 20 % g/v într-o soluţie de 0,9 % clorură de sodiu, în apă distilată sau într-un alt solvent pentru care există dovezi că este lipsit de efecte adverse asupra sistemului testat. În anumite circumstanţe şi cu o justificare ştiinţifică adecvată, substanţele solide pot fi testate, de asemenea, în stare pură prin aplicarea directă pe suprafaţa corneană, utilizând metoda camerei deschise (a se vedea punctul 32). Corneele sunt expuse la substanţele solide timp de patru ore, dar, la fel precum în cazul lichidelor sau al surfactanţilor, se pot utiliza durate de expunere alternative, cu o argumentare ştiinţifică corespunzătoare.

În funcţie de natura fizică şi de caracteristicile chimice (de exemplu, substanţe solide, lichide, vâscoase, comparativ cu lichide nevâscoase) ale substanţei chimice de testat, se pot utiliza diferite metode de tratament. Factorul critic este să se asigure că substanţa chimică de testat acoperă în mod adecvat suprafaţa epitelială şi că aceasta este îndepărtată în mod corespunzător în timpul etapelor de spălare. În mod normal, pentru substanţele chimice de testat în stare lichidă nevâscoase sau uşor vâscoase se utilizează o metodă cu camera închisă, iar pentru substanţele chimice de testat în stare lichidă semivâscoase şi vâscoase, precum şi pentru substanţele solide pure se utilizează o metodă cu camera deschisă.

În cazul metodei cu camera închisă, prin orificiile de dozare de pe suprafaţa superioară a camerei se introduce în camera anterioară suficientă substanţă chimică de testat (750 µl) pentru a acoperi porţiunea epitelială a corneei, iar orificiile sunt sigilate ulterior cu ajutorul dopurilor camerei în timpul expunerii. Este important să se asigure expunerea fiecărei cornee la o substanţă chimică de testat pentru o perioadă de timp adecvată.

În cazul metodei cu camera deschisă, inelul de fixare a ferestrei şi fereastra de sticlă din camera anterioară sunt îndepărtate înainte de tratament. Substanţa martor sau substanţa chimică de testat (750 µl sau substanţă de testat în cantitate suficientă pentru a acoperi complet corneea) se aplică direct pe suprafaţa epitelială a corneei cu ajutorul unei micropipete. În cazul în care o substanţă chimică de testat este dificil de pipetat, aceasta poate fi încărcată sub presiune într-o pipetă care funcţionează pe principiul dezlocuirii pozitive pentru a asista dozarea. Vârful unei astfel de pipete este introdus în vârful de distribuire al seringii astfel încât materialul să poată fi încărcat sub presiune în vârful de dezlocuire. În mod simultan, pistonul seringii este eliberat pe măsură ce este tras în sus. În cazul în care la nivelul vârfului pipetei apar bule de aer, substanţa chimică de testat este îndepărtată (expulzată) şi procesul se repetă până când vârful se umple fără a exista bule de aer. Dacă este necesar, se poate utiliza o seringă normală (fără ac), întrucât aceasta permite măsurarea unui volum precis de substanţă chimică de testat şi o aplicare mai uşoară la nivelul suprafeţei epiteliale a corneei. După dozare, fereastra de sticlă este înlocuită la nivelul camerei anterioare pentru a recrea un sistem închis.

Incubarea post-expunere

După perioada de expunere, se îndepărtează din camera anterioară substanţa chimică de testat, substanţa chimică martor negativ sau substanţa chimică martor pozitiv, iar epiteliul se spală de cel puţin trei ori (sau până când nu se mai constată vizual prezenţa substanţei chimice de testat) cu EMEM (care conţine roşu fenol). Pentru spălare se utilizează un mediu care conţine roşu fenol deoarece schimbarea de culoare a acestui indicator poate fi monitorizată pentru determinarea eficienţei spălării substanţelor de testare acide sau alcaline. Corneele se spală de mai mult de trei ori dacă roşul fenol este în continuare decolorat (galben sau purpuriu) sau dacă substanţa chimică de testat este în continuare

▼M7

vizibilă. După ce mediul nu mai conține substanță chimică de testat, corneele se spală pentru ultima dată cu EMEM (fără roșu fenol). EMEM (fără roșu fenol) se utilizează pentru spălarea finală pentru a se asigura îndepărtarea substanței roșu fenol din camera anterioară înainte de măsurarea opacității. Camera anterioară se reumple apoi cu EMEM fără roșu fenol.

În cazul lichidelor sau al surfactanților, după spălare, corneele se incubează pentru o perioadă suplimentară de două ore la 32 ± 1 °C. Un interval post-expunere mai lung poate fi util în anumite circumstanțe și necesitatea acestuia va fi examinată de la caz la caz. Corneele tratate cu substanțe solide se spală amănunțit după o perioadă de expunere de patru ore, fără a fi necesară o incubație suplimentară.

Opacitatea și permeabilitatea fiecărei cornee se înregistrează la sfârșitul perioadei de incubare post-expunere, în cazul substanțelor lichide și al surfactanților și la sfârșitul unei perioade de expunere de patru ore în cazul substanțelor solide nesurfactante. De asemenea, fiecare cornee se examinează vizual, înregistrându-se observațiile pertinente (de exemplu, exfolierea țesuturilor, reziduuri de substanță chimică de testat, tipare de opacifiere neuniformă). Observațiile respective pot fi importante deoarece acestea se pot reflecta în variații ale citirilor opacimetrului.

Substanțe chimice martor

În fiecare experiment se includ martori negativi sau grupuri martor solvent/vehicul și martori pozitivi testați în paralel.

Atunci când se testează o substanță lichidă cu puritate de 100 %, în metoda de testare BCOP se include un martor negativ testat în paralel (de exemplu, soluție de clorură de sodiu 0,9 % sau apă distilată) pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru criteriile finale ale testării. În plus, această metodă garantează faptul că nu va apărea o reacție de iritație din cauza condițiilor de analiză neadecvate.

Atunci când se testează o substanță lichidă diluată, un surfactant, sau o substanță solidă, în metoda de testare BCOP se include un grup martor solvent/vehicul pentru a putea detecta modificările nespecifice din sistemul testat și pentru a furniza un nivel de bază pentru punctele finale ale analizei. Se poate utiliza numai un solvent/vehicul pentru care nu există dovezi că are efecte adverse asupra sistemului testat.

O substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă se introduce în fiecare experiment ca martor pozitiv testat în paralel cu scopul de a verifica integritatea sistemului de testare și pentru desfășurarea corespunzătoare a acestuia. Cu toate acestea, pentru a garanta faptul că există posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției la martorul pozitiv, amploarea reacției iritante nu trebuie să fie excesivă.

Exemple de martori pozitivi pentru substanțele chimice de testat sunt etanol 100 % sau dimetilformamidă 100 %. Soluția de imidazol 20 % g/v într-o soluție de clorură de sodiu 0,9 % reprezintă un exemplu de martor pozitiv pentru substanțele chimice de testat în stare solidă.

Substanțele chimice etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau de produse sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

Opacitatea se determină prin măsurarea luminii transmise prin cornee. Opacitatea corneană este măsurată cantitativ cu ajutorul unui opacimetru, conducând la valori ale opacității măsurate pe o scară continuă.

Permeabilitatea este determinată prin măsurarea cantitativă a colorantului cu fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare corneene (și anume, epiteliul de pe suprafața exterioară a corneei prin endoteliul de pe suprafața

▼M7

interioară a corneei). Un ml de soluție de fluoresceină sodică (4 sau 5 mg/ml atunci când se testează substanțe lichide și surfactanți sau substanțe nesurfactante) se adaugă în camera anterioară a suportului cornean, care interferează cu porțiunea epitelială a corneei, iar camera posterioară, care interferează cu porțiunea endotelială a corneei, este umplută cu EMEM proaspăt. Suportul este apoi incubat în poziție orizontală timp de 90 ± 5 min la 32 ± 1 °C. Cantitatea de fluoresceină sodică care pătrunde în camera posterioară este măsurată cantitativ cu ajutorul unui spectrofotometru UV/VIS. Măsurătorile spectrofotometrice efectuate la 490 nm sunt înregistrate sub formă de valori ale densității optice (DO490) sau ale absorbanței, care sunt măsurate pe o scară continuă. Valorile permeabilității fluoresceinei sunt determinate prin utilizarea valorilor DO_{490} înregistrate de un spectrofotometru cu lumină vizibilă care folosește valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei.

Ca o variantă alternativă, se poate utiliza un cititor de plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, cu condiția: (i) să se poată stabili domeniul linear al cititorului de plăci pentru determinarea valorilor DO490 a fluoresceinei; și (ii) să se utilizeze volumul corect de mostre de fluoresceină în placa cu 96 de godeuri pentru a se obține valori ale DO_{490} echivalente cu valoarea standard de 1 cm a lungimii traiectoriei [acest aspect ar putea necesita un godeu umplut complet (în mod obișnuit 360 μl)].

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

După corectarea valorilor opacității și ale permeabilității medii (DO_{490}) pentru valorile opacității de fundal și ale permeabilității martorului negativ DO_{490}, valorile medii ale opacității și ale permeabilității DO_{490} pentru fiecare grup de tratament trebuie combinate într-o formulă dedusă în mod empiric pentru a calcula un scor privind iritarea *in vitro* (IVIS) pentru fiecare grup de tratament după cum urmează:

IVIS = valoarea opacității medii + (15 x valoarea permeabilității medii DO_{490})

Sina *et al*. (16) au raportat că această formulă a fost dedusă în urma unor studii interne și între laboratoare. Datele generate pentru o serie de 36 de compuși într-un studiu realizat între laboratoare au fost supuse unei analize multivariante pentru a determina ecuația cea mai potrivită pentru datele *in vivo* și cele *in vitro*. Această analiză a fost efectuată de cercetători de la două companii diferite, care au obținut ecuații aproape identice.

Valorile opacității și ale ermeabilității se evaluează, de asemenea, în mod independent pentru a determina, prin utilizarea doar a uneia dintre cele două caracteristici (a se vedea criteriile de decizie) dacă o substanță chimică de testat a provocat coroziune sau iritație severă.

Criterii de decizie

Valorile limită IVIS pentru identificarea substanțelor chimice de testat care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU) și substanțele chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („nicio categorie” din GHS al ONU) sunt prezentate în continuare:

IVIS	GHS al ONU
≤ 3	Nicio categorie
> 3; ≤ 55	Nu se poate prevedea
> 55	Categoria 1

Criterii de acceptare a studiului

Un test este considerat acceptabil în cazul în care pentru martorul pozitiv se obține o valoare IVIS cuprinsă în intervalul reprezentat de două deviații

▼M7

standard ale valorii medii actuale a martorilor testați anterior, care trebuie actualizată la fiecare trei luni sau de fiecare dată când un test care poate fi acceptat este efectuat în laboratoare în care testele sunt realizate rar (și anume, mai puțin de o dată pe lună). Reacțiile martorilor negativi sau cele ale grupului martor solvent/vehicul trebuie să conducă la valori ale opacității și permeabilității care sunt mai mici decât limitele superioare stabilite pentru valorile opacității și ale ermeabilității fundalului pentru corneele de bovine tratate cu martorii negativi sau cu grupurile martor solvent/vehicul respective. O singură serie de testare compusă din cel puțin trei cornee este suficientă pentru o substanță chimică de testat atunci când clasificarea este fără echivoc. Cu toate acestea, în cazul rezultatelor limită în prima serie de testare, se ia în considerare (dar nu este neapărat necesară) o a doua serie de testare, precum și o a treia serie în cazul unor rezultate IVIS medii discordante între primele două serii de testare. În acest context, un rezultat în prima serie de testare este considerat limită în cazul în care previziunile pe baza celor 3 cornee au fost neconcordante, astfel încât:

— 2 din cele 3 cornee au dat previziuni discordante din valoarea medie a tuturor celor 3 cornee SAU

— 1 din cele 3 cornee a dat o predicție discordantă din valoarea medie a tuturor celor 3 cornee ȘI rezultatul discordant a fost >10 unități IVIS din pragul limită de 55.

— În cazul în care noua serie de testare coroborează previziunea din prima serie de testare (pe baza valorii medii a IVIS), o decizie definitivă poate fi luată fără efectuarea de teste suplimentare. În cazul în care noua serie de testare conduce la o previziune neconcordantă cu testarea inițială (pe baza valorii medii a IVIS), se efectuează o a treia și ultimă serie de testare pentru a soluționa previziunile echivoce și pentru a clasifica substanța chimică de testat. Renunțarea la teste suplimentare pentru clasificare și etichetare este permisă în cazul în care oricare serie de testare are ca rezultat o predicție de categoria 1 din GHS al ONU.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanțe chimice de testat și martor

— Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de către Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc; numărul de înregistrare (Registry Number -RN) CAS, dacă se cunoaște;

— Puritatea și compoziția substanței chimice de testat/martor [în procent(e) de greutate], în măsura în care această informație este disponibilă;

— Proprietăți fizico-chimice precum starea fizică, volatilitatea, pH-ul, stabilitatea, clasa chimică, solubilitatea în apă care sunt relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Stabilitatea, dacă se cunoaște.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu.

Condițiile metodei de testare

— Opacimetrul utilizat (de exemplu, model și specificații) și reglajele instrumentului;

— Informații privind calibrarea pentru dispozitivele utilizate pentru măsurarea opacității și a permeabilității (de exemplu, opacimetru și spectrofotometru) pentru a asigura liniaritatea măsurătorilor;

— Tipul de suporturi corneene utilizate (de exemplu, modelul și specificațiile);

▼M7

— Descrierea altor echipamente utilizate;

— Procedura utilizată pentru a asigura integritatea (și anume, precizia și fiabilitatea) metodei de testare în timp (de exemplu, testarea periodică a substanțelor chimice de verificare).

Criteriile pentru un test acceptabil

— Domenii acceptabile pentru martorii pozitivi și negativi testați în paralel pe baza datelor anterioare;

— După caz, domenii pentru martorii etalon acceptabili testați în paralel pe baza datelor anterioare.

Colectarea și pregătirea ochilor

— Identificarea sursei ochilor (și anume, unitatea unde au fost colectați);

— Diametrul corneei ca măsură de vârstă a animalelor sursă și adecvarea pentru testare;

— Condițiile de depozitare și de transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp până la începerea testării, mediile de transport și condițiile de temperatură, toate antibioticele utilizate);

— Pregătirea și montarea corneelor de bovine, inclusiv specificații privind calitatea acestora, temperatura suporturilor corneene și criteriile de selecție a corneelor utilizate pentru testare.

Procedura de testare

— Numărul de duplicate utilizate;

— Identitatea martorilor pozitivi și negativi utilizați (dacă este cazul, de asemenea, a solventului și a martorilor etalon);

— Concentrația (concentrațiile) de substanță chimică de testat, aplicare, timpul de expunere și timpul de incubare post-expunere utilizate;

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— Descrierea criteriilor de decizie utilizate.

Rezultate

— Prezentarea sub formă de tabel a rezultatelor obținute cu fiecare probă testată [de exemplu, valorile opacității și ale DO490, precum și IVIS calculat pentru substanța chimică de testat și pentru martorii pozitivi negativi și etalon (dacă se includ), raportate sub formă de tabel, inclusiv datele din experimentele duplicat repetate, după caz, și valorile medii ± deviația standard pentru fiecare experiment];

— Descrierea altor efecte observate;

— Clasificarea GHS al ONU *in vitro* rezultată, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

Concluzie

▼**M7**

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy, European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibil la: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Disponibil la: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică etalon: O substanță utilizată chimică în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță chimică etalon trebuie să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă(e) și sigură(e); (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe chimice testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Cornee: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Opacitatea corneană crescută este un indicator al unei leziuni a corneei. Opacitatea poate fi evaluată în mod subiectiv, astfel cum se procedează în cazul testului Draize pe ochi de iepure, sau în mod obiectiv, cu ajutorul unui instrument cum este „opacimetrul”.

Permeabilitatea corneană: Măsurarea cantitativă a lezării epiteliului cornean printr-o determinare a cantității de colorant fluoresceină sodică care străbate toate straturile celulare ale corneei.

Iritație oculară: Producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului” și „categoria 2 din GHS al ONU” (4).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals printr-o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Scor privind iritarea *in vitro* (IVIS): O formulă dedusă în mod empiric utilizată în metoda de testare BCOP în care valorile opacității medii și cele ale permeabilității medii pentru fiecare grup de tratament sunt combinate într-un scor *in vitro* unic pentru fiecare grup de tratament. IVIS = valoarea opacității medii + (15 x valoarea permeabilității medii).

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „lezare oculară gravă”.

▼M7

Amestec: Un amestec sau o soluție compus(ă) din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție (4).

Martor negativ: O probă duplicat netratată, care conține toate componentele sistemului testat. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul testat.

Neclasificat: Substanțe chimice care nu sunt clasificate pentru iritația oculară (categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU) sau lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „nicio categorie” din GHS al ONU.

Opacimetru: Instrument utilizat pentru a măsura „opacitatea corneană” prin evaluarea cantitativă a transmisiei luminii prin cornee. Instrumentul tipic are două compartimente, fiecare dintre acestea fiind dotat cu propria sursă de lumină și propria celulă fotoelectrică. Unul dintre compartimente este utilizat pentru corneea tratată, iar cel de-al doilea servește pentru a calibra și a regla punctul de zero al instrumentului. Lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele în lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și valoarea numerică a opacității se afișează pe un ecran digital.

Martor pozitiv: O probă duplicat care conține toate componentele unui sistem testat și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară”.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare.

Lezarea oculară gravă: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochilor” și cu „categoria 1 din GHS al ONU” (4).

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele sistemului testat, inclusiv solventul sau vehiculul care este analizat împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. În plus, atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Substanță: Elemente chimice și compușii lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (4).

▼M7

Surfactant: Denumit, de asemenea, agent cu activitate de suprafață, acesta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate reduce tensiunea superficială a unui lichid și, prin urmare, permite producerea spumei sau pătrunderea substanțelor solide; este cunoscut, de asemenea, ca agent tensioactiv.

Amestec care conține surfactant: În contextul acestei metode de testare, acesta este un amestec care conține una sau mai mulți surfactanți cu o concentrație finală >5 %.

Abordare descendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) față de alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea riscurilor, înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu, și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (4).

Categoria 1 din GHS al ONU: A se vedea „lezarea oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU: A se vedea „iritația oculară”.

„Nicio categorie” din GHS al ONU: Substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificare corespunzătoare categoriei 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU. Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

Metodă de testare validată: Metodă de testare pentru care au fost completate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității pentru ca aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a formula și a susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

▼M7

Apendicele 2

CAPACITATEA DE ESTIMARE A METODEI DE TESTARE BCOP

Tabelul 1

Capacitatea de estimare a BCOP pentru identificarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă [cat. 1 vs nu cat. 1 (cat. 2 + nicio cat.) din GHS al ONU/ Regulamentul CLP al UE; cat. I vs nu cat. I (cat. II+ cat. III+ cat. IV) EPA SUA]

Clasificare Sistem	Nr.	Precizie		Sensibilitate		Rezultate fals negative		Specificitate		Rezultate fals pozitive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
GHS al ONU Regulamentul CLP al UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EPA SUA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabelul 2

Capacitatea de estimare a BCOP pentru identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă („substanțe cu caracter neiritant”) [nicio cat. vs nu cat. „nicio cat.” (cat. 1 + cat. 2) din GHS al ONU/Regulamentul CLP al UE; cat. IV vs nu cat. IV (cat. 1 + cat. 2 + cat. 3) EPA SUA]

Clasificare Sistem	Nr.	Precizie		Sensibilitate		Rezultatele fals negative		Specificitate		Rezultate fals pozitive	
		%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.
GHS al ONU Regulamentul CLP al UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA SUA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Apendicele 3

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE BCOP

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării riscurilor oculare ale celor 13 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele la nivel ocular pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) (17) și sistemul de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2b, sau neclasificat) (4). Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, existența datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor *in vitro* de calitate superioară furnizate de metoda de testare BCOP. Informațiile de referință sunt disponibile în registrul SSD (3) și în documentul ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metoda de testare BCOP (2) (18).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda de testare BCOP

Substanță chimică	NR. CAS	Clasă chimică (1)	Forma fizică	Clasificare *in vivo* (2)	Clasificare BCOP
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorura de 2,6-Diclor-benzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
Etil-2-metil-acetoacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2 (3)	Nu se poate efectua o estimare precisă/ fiabilă
EDTA, sare dipotasică	25102-12-9	Amină, acid carboxilic (sare)	Solid	Neclasificat	Neclasificat
Tween 20	9005-64-5	Ester, polieter	Lichid	Neclasificat	Neclasificat
2-mercaptopirimidină	1450-85-7	Halogenură de acil	Solid	Neclasificat	Neclasificat
Fenilbutazonă	50-33-9	Heterociclu	Solid	Neclasificat	Neclasificat

▼**M7**

Substanță chimică	NR. CAS	Clasă chimică (1)	Forma fizică	Clasificare *in vivo* (2)	Clasificare BCOP
Eter lauric de polioxietilenă 23 (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alcool	Lichid	Neclasificat	Neclasificat

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

(1) Clasele chimice sunt desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la http//www.nlm.nih.gov/mesh)

(2) Pe baza rezultatelor furnizate de testul in vivo pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS al ONU (4).

(3) Clasificarea drept categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 1 din 3 versus 2 din 3 animale, cu efecte din ziua 7, necesar pentru a se efectua o clasificare în categoria 2A. Studiu in vivo a inclus 3 animale. Toți parametri studiați, cu excepția roșeții conjunctivei la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua7a avut un punctaj de roșeață a conjunctivei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în termen de 10 zile.

▼M7

Apendicele 4

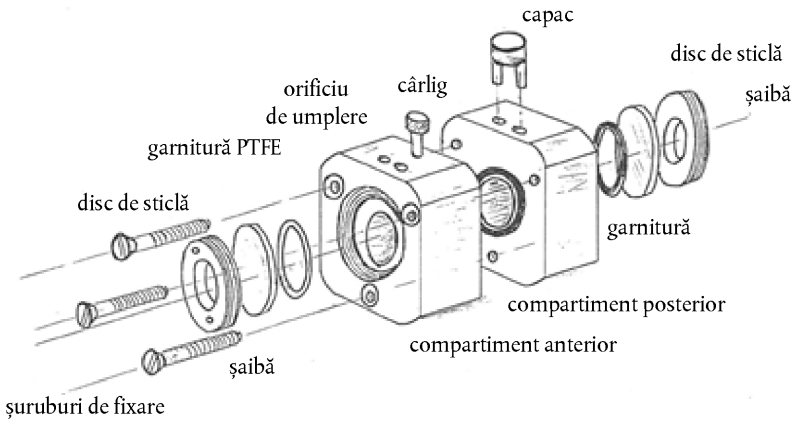
SUPORTUL CORNEAN BCOP

Suporturile corneene BCOP sunt confecționate dintr-un material inert (de exemplu, polipropilenă). Suporturile sunt formate din două jumătăți (o cameră anterioară și una posterioară) și au două camere cilindrice interne similare. Fiecare cameră are un volum de 5 ml și conține la capăt un geam din sticlă, prin care se observă și se înregistrează opacitatea. Camerele interne au un diametru de 1,7 cm și o adâncime de 2,2 cm ([1]). Eventualele scurgeri sunt prevenite cu ajutorul unei garnituri amplasate în camera posterioară. Corneele se plasează cu partea endotelială pe garnitura camerei posterioare, iar camerele interioare se plasează pe partea epitelială a corneelor. Camerele sunt fixate cu trei șuruburi din oțel inoxidabil aflate pe muchiile exterioare ale camerei. La capătul fiecărei camere se află un geam de sticlă amovibil, care permite accesul facil la cornee. De asemenea, se plasează o garnitură între geamul de sticlă și cameră pentru prevenirea scurgerilor. Două orificii situate în partea superioară a fiecăreia dintre cele două camere permit introducerea și îndepărtarea mediului și a substanțelor chimice de testare. Aceste orificii sunt închise cu capace de cauciuc pe perioadele de tratament și de incubație. Transmisia luminii prin suporturile corneene se poate schimba deoarece efectele uzurii fizice sau ale acumulării de reziduuri chimice specifice în orificiile camerei interioare sau pe geamul de sticlă pot afecta dispersia sau reflexia luminii. Drept consecință, transmisia luminii de bază ar putea înregistra creșteri sau scăderi (și în opoziție cu citirile de bază ale opacității) prin suportul corneean și ar putea fi evidențiate drept modificări semnificative ale măsurătorilor inițiale de bază preconizate pentru opacitatea coorneană în camerele individuale (și anume, valorile inițiale de opacitate corneeană în suporturi corneene individuale specifice pot diferi în mod obișnuit cu mai mult de 2 sau 3 unități de opacitate față de valorile de bază preconizate). Fiecare laborator trebuie să ia în considerare crearea unui program pentru evaluarea modificărilor transmisiei luminii prin suporturile corneene, în funcție de natura substanțelor chimice testate și frecvența utilizării camerelor. Pentru a stabili valorile de bază, suporturile corneene pot fi verificate înainte de utilizarea sistematică prin măsurarea nivelului de bază al valorilor opacității (sau ale transmisiei luminii) a camerelor umplute cu mediu complet, fără cornee. Suporturile corneene sunt verificate apoi periodic pentru a se ține cont de modificările aduse transmisiei luminii în timpul perioadelor de utilizare. Fiecare laborator poate stabili frecvența de verificare a suporturilor corneene, în funcție de substanțele chimice utilizate, frecvența de utilizare și observațiile modificărilor valorilor de bază ale opacității corneene. În cazul în care se observă modificări semnificative în transmisia luminii prin suporturile corneene, se ia în considerare efectuarea de proceduri corespunzătoare de curățare și/sau lustruire a suprafeței interioare a suporturilor corneene sau de înlocuire a acestora.

([1]) Dimensiunile indicate se referă la un suport cornean utilizat pentru bovine a căror vârstă variază între 12 și 60 de luni. În cazul în care se utilizează animale cu vârsta cuprinsă între 6-12 luni, suportul trebuie să fie proiectat astfel încât volumul fiecărei camere să fie de 4 ml, iar fiecare dintre camerele interioare să aibă un diametru de 1,5 cm și o adâncime de 2,2 cm. Este foarte important ca raportul între suprafața zonei corneene expuse și volumul camerei posterioare a suporturilor corneene noi să fie identic cu raportul existent în cazul suportului cornean tradițional. Acest lucru este necesar pentru a asigura determinarea corectă a valorilor permeabilității, în scopul calculării IVIS prin formula propusă.

▼M7

Suport cornean: diagramă descompusă



▼M7

Apendicele 5

OPACIMETRUL

Opacimetrul este un dispozitiv de măsurare a transmisiei luminii. De exemplu, pentru echipamentele OP-KIT ale Electro Design (Riom, Franța) utilizate în procesul de validare a metodei de testare BCOP, lumina care provine de la o lampă cu halogen este trimisă printr-un compartiment de control (o cameră goală fără ferestre sau lichid) la o celulă fotoelectrică și comparată cu lumina trimisă prin compartimentul experimental, care adăpostește camera care conține corneea, către o celulă fotoelectrică. Diferențele în lumina transmisă către celulele fotoelectrice se compară și valoarea numerică a opacității se afișează pe un ecran digital. Se stabilesc unitățile de opacitate. Alte tipuri de opacimetre cu o structură diferită (de exemplu, care nu necesită măsurătorile paralele ale compartimenelor de control și de experiment) pot fi utilizate, dacă se dovedește că acestea oferă rezultate similare cu echipamente validate.

Opacimetrul trebuie să asigure un răspuns linear, aflat într-un interval de valori ale opacității corespunzătoare limitelor utilizate pentru diferitele clasificări prevăzute în modelul predictiv (și anume, până la limitele care provoacă coroziune/iritație severă). Pentru obținerea unor valori lineare și precise de până la 75-80 unități de opacitate, este necesară calibrarea opacimetrului cu ajutorul unor dispozitive etalon. Dispozitivele etalon sunt plasate în camera de calibrare (o cameră corneană proiectată să conțină dispozitivele de calibrare) și se citesc valorile indicate de opacimetru. Camera de calibrare este proiectată astfel încât dispozitivele etalon să fie plasate la aproximativ aceeași distanță între sursa de lumină și celula fotoelectrică la care vor fi plasate corneele pe durata măsurării opacității. Valorile de referință și punctul de referință inițial depind de tipul de echipament utilizat. Linearitatea măsurătorilor de opacitate se asigură prin proceduri (specifice instrumentului) adecvate. De exemplu, pentru echipamentele OP-KIT ale Electro Design (Riom, Franța), opacimetrul este calibrat la 0 unități de opacitate, utilizând camera de calibrare fără niciun dispozitiv etalon. După aceasta, se plasează pe rând trei dispozitive etalon diferite în camera de calibrare și se măsoară opacitatea în fiecare caz. Dispozitivele etalon nr. 1, 2 și 3 trebuie să conducă la valori ale opacității egale cu valorile predeterminate de 75, 150 și, respectiv, 225 de unități de opacitate, cu o variație de ± 5 %.

▼M7

B.48. **METODA DE TESTARE A OCHIULUI IZOLAT DE PUI PENTRU IDENTIFICAREA I) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PROVOACĂ LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A II) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZAREA OCULARĂ GRAVĂ**

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 438 (2013). Metoda de testare a ochiului izolat de pui (ICE) a fost evaluată de către Comitetul de coordonare la nivel de agenții privind validarea metodelor alternative (ICCVAM), în coroborare cu Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) și Centrul Japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) în anul 2006 și 2010 (1) (2) (3). În cadrul primei evaluări, ICE a fost aprobată ca o metodă de testare valabilă din punct de vedere științific pentru a fi utilizată ca test pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1), astfel cum sunt definite în sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) (2) (4) și Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). În cadrul celei de a doua evaluări, metoda de testare ICE a fost evaluată în vederea utilizării ca test de screening pentru a identifica substanțele chimice neclasificate în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU (3) (4). Rezultatele din studiul de validare și recomandările grupului de revizuire inter pares au menținut recomandarea inițială de utilizare a ICE pentru clasificarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), având în vedere faptul că baza de date disponibilă a rămas neschimbată de la validarea inițială a ICCVAM. În stadiul respectiv, nu au fost sugerate recomandări suplimentare pentru extinderea domeniului de aplicabilitate a ICE pentru a include, de asemenea, alte categorii. O reevaluare a setului de date *in vitro* și *in vivo* utilizat în studiul de validare a fost efectuată cu scopul de a evalua utilitatea ICE pentru identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă (5). Reevaluarea a ajuns la concluzia că metoda de testare ICE poate fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțe chimice care nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU (4) (5). Această metodă de testare include utilizările și limitările recomandate ale metodei de testare ICE pe baza evaluărilor respective. Principalele diferențe între versiunea inițială din anul 2009 și versiunea actualizată din anul 2013 a orientării OCDE privind testarea includ, dar nu se limitează la utilizarea metodei de testare ICE la identificarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare în conformitate cu GHS al ONU, o actualizare a elementelor raportului de testare, o actualizare a apendicelui 1 privind definițiile și o actualizare a apendicelui 2 privind substanțele chimice de verificare.

În prezent, este general acceptat faptul că în viitorul apropiat niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va putea înlocui testul ocular *in vivo* Draize pentru a efectua estimări în cadrul întregii game de iritații pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) ar putea înlocui testul ocular Draize (6). Abordarea descendentă (7) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are potențial iritant ridicat, în timp ce abordarea ascendentă (7) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu cauzează iritație oculară suficientă pentru a necesita o clasificare. Metoda de testare ICE este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite cazuri și cu limite specifice, astfel cum sunt descrise la punctele 8-10, pentru clasificarea

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

▼M7

riscurilor la nivel ocular și etichetarea substanțelor chimice. Cu toate că nu este considerată validă ca metodă de testare de sine stătătoare de substituire a testului *in vivo* pe ochi de iepure, metoda de testare ICE este recomandată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare precum abordarea descendentă propusă de către Scott *et al.* (7) pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume, substanțele chimice care urmează să fie încadrate în categoria 1 din GHS al ONU fără testare suplimentară (4). Metoda de testare ICE este recomandată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care să nu necesită clasificare în ceea ce privește iritația oculară și lezarea oculară gravă, astfel cum sunt definite în GHS al ONU („nicio categorie", NC) (4), și, prin urmare, poate fi utilizată ca o etapă inițială în cadrul unei strategii de testare ascendente (7). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu se preconizează să cauzeze lezare oculară gravă sau care nu este clasificată pentru iritația oculară/lezare oculară gravă prin metoda de testare ICE ar necesita teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a se stabili o clasificare definitivă. În plus, este necesară consultarea autorităților de reglementare competente înainte de a utilizarea ICE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare decât cele GHS al ONU.

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul riscurilor la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a provoca sau nu toxicitate într-un ochi enucleat de pui. Efectele toxice la nivelul corneei sunt măsurate prin (i) o evaluare calitativă a opacității, (ii) o evaluare calitativă a leziunilor epiteliului pe baza aplicării de fluoresceină în ochi (retență de fluoresceină), (iii) o măsurare cantitativă a creșterii grosimii (inflamare) și (iv) o evaluare calitativă a leziunilor morfologice macroscopice ale suprafeței. Opacitatea corneană, inflamarea și evaluările leziunilor după expunerea la o substanță chimică de testat se stabilesc în mod individual, apoi rezultatele se combină pentru a se obține o clasificare a iritației oculare.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul propus în documentul de orientare nr. 160 al OCDE (8), care a fost elaborat în urma studiului internațional de validare ICCVAM (1) (3) (9), cu contribuții din partea Centrului european pentru validarea metodelor alternative, a Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative și a Departamentului TNO pentru calitatea vieții, toxicologie și farmacologie aplicată (Țările de Jos). Protocolul a fost întocmit pe baza informațiilor conținute în protocoalele publicate și în protocolul utilizat în prezent de către TNO (10) (11) (12) (13) (14).

O gamă largă de substanțe chimice a fost testată în cadrul procesului de validare care sta la baza acestei metode de testare, iar baza de date empirice a studiului de validare a cuprins 152 de substanțe chimice, incluzând 72 de substanțe chimice și 80 de amestecuri (5). Metoda de testare este aplicabilă substanțelor solide, lichide, emulsiilor și gelurilor. Substanțele lichide pot fi apoase sau neapoase; substanțele solide pot fi solubile sau insolubile în apă. Gazele și aerosolii nu au fost încă evaluați în cadrul unui studiu de validare.

Metoda de testare ICE poate fi utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă, și anume, substanțele chimice care urmează să fie clasificate în categoria 1 din GHS al ONU (4). Atunci când sunt utilizate în acest scop, limitele de aplicare identificate pentru metoda de testare ICE se bazează pe rata ridicată de rezultate fals pozitive pentru alcoolii și ratele ridicate de rezultate fals negative pentru substanțele solide și surfactanți (1) (3) (9). Cu toate acestea, în acest context (categoria 1 din GHS al ONU identificată ca nefiind categoria 1 din GHS al ONU), ratele de rezultate fals negative nu sunt critice având în vedere faptul că toate substanțele chimice care conduc la rezultate negative ar fi testate ulterior utilizând un test(e) *in vitro* validat(e) în mod corespunzător sau, ca ultimă opțiune, la iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, utilizând o strategie de testare secvențială cu o abordare pe baza forței probante. Se remarcă faptul că substanțele solide pot conduce la condiții de expunere extreme și variabile în testul Draize de iritație oculară *in vivo*, care pot

▼M7

avea ca rezultat estimări irelevante în ceea ce privește potențialul lor iritant real (15). Inspectorii ar putea avea în vedere utilizarea acestei metode de testare pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat pozitiv se acceptă drept indicator al lezării oculare grave, și anume încadrarea în categoria 1 din GHS al ONU fără testări suplimentare. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute cu ajutorul alcoolilor se interpretează cu prudență, având în vedere riscul de producere a unor supraestimări.

Atunci când este utilizată pentru a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU), metoda de testare ICE are o precizie generală de 86 % (120/140), o rată de rezultate fals pozitive de 6 % (7/113) și o rată de rezultate fals negative de 48 % (13/27) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate în conformitate cu sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5).

Metoda de testare ICE poate fi utilizată, de asemenea, pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă în temeiul sistemului de clasificare GHS al ONU (4). Este necesară consultarea autorităților de reglementare competente înainte de a utiliza ICE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare. Această metodă de testare poate fi utilizată pentru toate tipurile de substanțe chimice, prin care un rezultat negativ ar putea fi acceptat pentru neclasificarea unei substanțe chimice pentru iritația oculară și lezarea oculară gravă. Cu toate acestea, pe baza un singur rezultat din baza de date de validare, vopsele antivegetative organice care conțin solvent pot prezenta subestimări (5).

Atunci când este utilizată pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară și lezarea oculară gravă, metoda de testare ICE are o precizie generală de 82 % (125/152), o rată de rezultate fals pozitive de 33 % (26/79) și o rată de rezultate fals negative de 1 % (1/73) în comparație cu datele privind metoda de testare *in vivo* pe ochi de iepure clasificate în conformitate cu sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5). În cazul în care substanțele chimice din cadrul anumitor categorii (și anume, vopsele antivegetative organice care conțin solvent) sunt eliminate din baza de date, precizia metodei de testare ICE este de 83 % (123/149), rata de rezultate fals pozitive este de 33 % (26/78), iar rata de rezultate fals negative este de 0 % (0/71) în ceea ce privește sistemul de clasificare GHS al ONU (4) (5).

Metoda de testare ICE nu este recomandată pentru identificarea substanțelor chimice de testat care sunt clasificate drept iritante la nivel ocular (și anume, categoria 2 sau categoria 2A din GHS al ONU) sau substanțele chimice de testat care sunt clasificate drept ușor iritante la nivel ocular (categoria 2B din GHS al ONU) având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU clasificate greșit drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU și de substanțe chimice din categoria „nicio categorie” din UN GHS al ONU clasificate excesiv drept categoria 2, 2A sau 2B din GHS al ONU. În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

Toate procedurile efectuate pe ochi de pui trebuie să respecte regulamentele și normele de manipulare a materialelor de origine umană sau animală, precum țesuturi și lichide tisulare, fără a se limita la acestea. Sunt recomandate măsurile de precauție universale aplicabile în laboratoare (16).

Cu toate că metoda de testare ICE nu ia în considerare leziunile conjunctivale și iridiane ca fiind evaluate în metoda de testare a iritării ochiului de iepure, acesta abordează efectele corneei, care sunt principalul motor de clasificare *in vivo* atunci când se ia în considerare clasificarea GHS al ONU. De asemenea, deși reversibilitatea leziunilor corneene nu poate fi evaluată în mod separat prin metoda de testare ICE, s-a propus, pe baza studiilor pe ochi de iepure, utilizarea unei evaluări a adâncimii inițiale a leziunii corneene pentru a identifica anumite tipuri de efecte ireversibile (17). În special, sunt necesare cunoștințe științifice suplimentare pentru a înțelege modul în care se produc efectele ireversibile care

▼M7

nu au legătură cu leziunea inițială de nivel ridicat. În sfârșit, metoda de testare ICE nu permite evaluarea toxicității sistemice potențiale asociate expunerii oculare.

Această metodă de testare va fi actualizată periodic, pe măsură ce se iau în considerare noi informații și date. De exemplu, histopatologia ar putea fi utilă atunci când este necesară o caracterizare mai cuprinzătoare a leziunilor corneene. Pentru a evalua această posibilitate, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii și să pregătească exemplarele histopatologice care pot fi utilizate pentru a dezvolta o bază de date și criterii de decizie care pot îmbunătăți în continuare acuratețea acestei metode de testare. OCDE a elaborat un document de orientare privind utilizarea metodelor de testare *in vitro* a toxicității oculare care include proceduri detaliate privind colectarea de specimene histopatologice și informații cu privire la locul de prezentare a specimenelor și/sau a datelor cu privire la histopatologie (8).

Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată această testare trebuie să utilizeze substanțele chimice de verificare menționate în apendicele 2. Un laborator poate utiliza substanțele chimice respective pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește aplicarea metodei de testare ICE înainte de a transmite datele analizei ICE în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare ICE este un model organotipic care permite menținerea pe termen scurt a ochiului de pui *in vitro*. În cadrul acestei metode de testare, leziunile provocate de substanța chimică de testat sunt evaluate în funcție de inflamarea corneană, opacitate și retenția de fluoresceină. În timp ce ultimii doi parametri presupun o evaluare calitativă, analiza inflamării corneene asigură o evaluare cantitativă. Fiecare măsurare este transformată într-un scor cantitativ utilizat pentru a se calcula un indice general de iritare sau primește un indice calitativ utilizat pentru a desemna o clasificare a riscurilor *in vitro* la nivel ocular, fie drept categoria 1 din GHS al ONU, fie drept neclasificat conform GHS al ONU. Oricare dintre cele două rezultate poate fi utilizat ulterior pentru a estima potențialul de lezare oculară *in vivo* sau nicio cerință pentru clasificarea riscurilor la nivel ocular prezentate de o substanță chimică de testat (a se vedea criteriile de decizie). Cu toate acestea, substanțele chimice pentru care nu se preconizează faptul că provoacă leziuni oculare grave sau care nu sunt clasificate prin metoda de testare ICE nu pot fi clasificate (a se vedea punctul 11).

Sursa și vârsta ochilor de pui

Până în prezent, pentru această evaluare au fost utilizați ochi colectați de la pui sacrificați în abatoare pentru consumul uman, nefiind necesare animale de laborator. Sunt utilizați exclusiv ochi proveniți de la animale considerate adecvate pentru consumul uman.

Cu toate că nu a fost efectuat un studiu controlat de evaluare a vârstei optime a puilor, vârsta și greutatea puilor utilizați până în prezent pentru această metodă de testare sunt cele ale puilor de primăvară procesați în mod normal de un abator (și anume, de aproximativ 7 săptămâni, 1,5– 2,5 kg).

Colectarea și transportul ochilor la laborator

Capetele se îndepărtează imediat după sedarea puilor, de regulă prin șoc electric și incizie la nivelul gâtului pentru scurgerea sângelui. Se recomandă identificarea unei ferme de pui aflate în apropierea laboratorului, astfel încât capetele să fie transferate de la abator către laborator într-un timp suficient de scurt pentru a reduce riscul de deteriorare și/sau contaminare bacteriană. Perioada de timp dintre colectarea capetelor și plasarea în camera de suprafuziune după enucleere trebuie să fie redusă la minim (în mod normal, în două ore) pentru a se asigura îndeplinirea criteriilor de acceptare ale testului. Toți ochii utilizați pentru testare trebuie să provin din același grup de ochi și să fie colectați în aceeași zi.

▼M7

Deoarece ochii sunt disecați în laborator, capetele se transportă intacte de la abator, la temperatură ambiantă (de regulă între 18 °C și 25 °C), în cutii de plastic și se mențin umede cu prosoape înmuiate în soluție salină izotonică.

Criterii de selecție și numărul de ochi utilizați în metoda ICE

Se resping ochii care, după enucleare, prezintă un nivel de bază ridicat al colorării cu fluoresceină și anume, > 0,5) sau opacitate corneană (și anume, > 0,5).

Fiecare grup de testare și martorul pozitiv testat în paralel este format din cel puțin trei ochi. Grupul martor negativ sau martorul solvent (în cazul în care se utilizează un solvent diferit de soluția salină) este constituit din cel puțin un ochi.

În cazul materialelor solide care conduc la un rezultat NC conform GHS, se recomandă o a doua determinare a trei ochi pentru a confirma sau a elimina rezultatele negative.

PROCEDURĂ

Pregătirea ochilor

Pleoapele sunt excizate cu atenție, astfel încât să nu se lezeze corneea. Integritatea corneană este evaluată rapid cu ajutorul unei picături de soluție de fluoresceină sodică 2 % (g/v) aplicată pe suprafața corneană timp de câteva secunde, care apoi se clătește cu soluție salină izotonică. Ochii tratați cu fluoresceină sunt apoi examinați cu un microscop cu lampă cu fantă, urmărindu-se eventualele leziuni ale corneei (și anume, valori ale retenției de fluoresceină și opacității corneene ≤0,5).

În cazul în care nu prezintă leziuni, ochiul este îndepărtat din orbită cu atenție, astfel încât corneea să nu fie lezată. Globul ocular este scos din orbită prin fixarea membranei nictitante cu ajutorul unui forceps chirurgical, apoi mușchii oculari se taie cu un foarfece îndoit, cu vârf bont. Este important să se evite lezarea corneei ca urmare a unei presări excesive (și anume, leziuni de compresie).

Atunci când ochiul este îndepărtat din orbită, se păstrează atașată o porțiune vizibilă a nervului optic. După îndepărtarea din orbită, ochiul este plasat pe o suprafață absorbantă, iar membrana nictitantă și alte țesuturi conjunctive sunt eliminate.

Ochiul enucleat este prins cu o clemă din oțel inoxidabil, cu corneea poziționată vertical. Clema este introdusă ulterior într-o cameră a aparatului de suprafuziune (18). Clemele sunt introduse în aparatul de suprafuziune astfel încât corneea să fie complet irigată cu soluție izotonică (3-4 picături pe minut sau 0,1-0,15 ml/min). Temperatura camerelor aparatului de superfuziune se menține la 32 ± 1,5 °C. În apendicele 3 este prezentată o diagramă a aparatului tipic de suprafuziune și a clemelor pentru ochi, care pot achiziționate din comerț sau confecționate. Aparatul poate fi modificat pentru a respecta cerințele din anumite laboratoare (de exemplu, pentru un număr diferit de ochi).

După ce au fost introduși în aparatul de suprafuziune, ochii sunt examinați din nou cu un microscop oftalmologic pentru eventuale leziuni apărute în timpul procedurii de disecție. În acest moment, se măsoară de asemenea, grosimea corneei în vârful său, cu ajutorul dispozitivului de măsurare a adâncimii atașat microscopului cu lampă cu fantă. Se înlocuiesc ochii care prezintă: (i) un coeficient al retenției de fluoresceină > 0,5; (ii) opacitate corneană >0,5; sau (iii) orice semne suplimentare de leziuni. În cazul ochilor care nu sunt respinși pe baza acestor criterii, se exclud ochii cu o grosime a corneei care deviază cu peste 10 % de la valoarea medie a tuturor ochilor. Utilizatorii trebuie să cunoască faptul că microscoapele cu lampă cu fantă pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită. Această lățime se stabilește la 0,095 mm.

▼M7

După examinarea și acceptarea ochilor, aceștia sunt incubați timp de aproximativ 45-60 de minute pentru a fi echilibrați cu sistemul de testare înaintea dozării. După perioada de echilibrare, se înregistrează o valoare de referință 0 a grosimii și opacității corneei, care va fi utilizată ca valoare de bază (și anume, momentul de timp egal cu 0). Cantitatea de fluoresceină determinată în momentul disecției este utilizată ca valoare de referință măsurată pentru acea caracteristică.

Aplicarea substanței chimice de testat

Imediat după măsurarea valorii de referință zero, ochiul (aflat în suportul său) este extras din aparatul de suprafuziune și plasat într-o poziție orizontală, iar substanța chimică de testat se aplică pe cornee.

De regulă, substanțele chimice de testat lichide se testează nediluate, dar pot fi diluate dacă se consideră necesar (de exemplu, în cadrul elaborării testelor). Solventul utilizat de preferință pentru substanțele chimice de testat diluate este serul fiziologic. Cu toate acestea, solvenți alternativi pot fi utilizați în condiții controlate, cu condiția ca adecvarea solvenților diferiți de serul fiziologic să fie demonstrată.

Substanțele chimice de testat lichide se aplică pe cornee astfel încât întreaga suprafață a acesteia să fie acoperită uniform cu substanța chimică de testat; volumul standard este de 0,03 ml.

Dacă este posibil, substanțele chimice de testat solide se macină cât mai fin posibil cu ajutorul unui mojar cu pistil sau al unui instrument de măcinat comparabil. Pulberea se aplică pe cornee astfel încât suprafața să fie acoperită uniform cu substanța chimică de testat; cantitatea standard este de 0,03 g.

Substanța chimică de testat (lichidă sau solidă) se aplică timp de 10 secunde, după care ochiul se clătește cu soluție salină izotonică (aproximativ 20 ml) la temperatura camerei. După aceasta, ochiul (în suportul său) este reintrodus în aparatul de suprafuziune, în poziția verticală inițială. Dacă este necesar, clătirea suplimentară poate fi utilizată după aplicarea de 10 secunde și la intervale de timp ulterioare (de exemplu, la descoperirea de reziduuri de substanță chimică de testat pe cornee). În general, cantitatea de soluție salină utilizată pentru clătire nu este critică, dar observarea aderenței substanței chimice la cornee este importantă.

Substanțele chimice martor

În fiecare experiment se introduc martori negativi testați în paralel sau martori solvent/vehicul și martori pozitivi.

Atunci când se testează substanțe lichide 100 % sau substanțe solide prin metoda de testare ICE, se utilizează ser fiziologic ca martor negativ pentru a se detecta modificări nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare.

Atunci când sunt testate substanțe lichide diluate, metoda de testare prevede un grup de martori solvent/vehicul testat în paralel pentru a se detecta modificările nespecifice ale sistemului de testare și a se preveni un efect iritant în urma condițiilor de testare. Conform punctului 31, se poate utiliza doar un solvent/vehicul care nu afectează în mod negativ sistemul de testare.

În fiecare experiment se introduce un martor pozitiv testat în paralel constând într-un iritant ocular pentru a verifica dacă se obține un răspuns adecvat. Având în vedere faptul că testul ICE este utilizat în această metodă de testare pentru a identifica corozivi sau iritanții severi, martorul pozitiv trebuie să fie o substanță chimică de referință care provoacă un răspuns sever în cadrul acestei metode de testare. Cu toate acestea, pentru a se asigura evaluarea variabilității răspunsului martorului pozitiv în timp, dimensiunea răspunsului sever nu trebuie să fie

▼M7

excesiv de mare. Este necesară generarea de suficiente date *in vitro* pentru martorul pozitiv, astfel încât să poată fi calculat un interval statistic acceptabil pentru acesta. În cazul în care nu sunt disponibile date adecvate precedente privind metoda de testare ICE pentru un anumit martor pozitiv, poate fi necesară efectuarea de studii pentru a furniza aceste informații.

Exemple de martori pozitivi pentru substanțele chimice de testat lichide sunt acidul acetic 10 % sau clorura de benzalconiu 5 %, în timp ce exemple de martori pozitivi pentru substanțe chimice de testat solide sunt hidroxidul de sodiu sau imidazolul.

Substanțele chimice etalon sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant la nivel ocular al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau de produse sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante la nivel ocular într-un interval specific de reacții iritante.

Caracteristici măsurate

Corneele tratate sunt evaluate înainte tratamentului și la 30, 75, 120, 180 și 240 minute (± 5 minute) după spălarea post-tratament. Aceste momente de observare permit un număr adecvat de măsurători pe parcursul celor patru ore de tratament, lăsând un interval suficient între măsurători pentru efectuarea observațiilor necesare la nivelul tuturor ochilor.

Caracteristicile evaluate sunt opacitatea corneană, inflamarea, retenția de fluoresceină și efectele morfologice (de exemplu, corodarea sau detașarea epiteliului). Cu excepția retenției de fluoresceină (determinată numai înainte de tratament și la 30 de minute după expunerea la substanța chimică de testat), toate caracteristicile se determină în fiecare dintre momentele de observare menționate mai sus.

Se recomandă realizarea de fotografii pentru documentarea opacității corneene, a retenției de fluoresceină, a efectelor morfologice și, dacă s-au efectuat, a studiilor histopatologice.

După examinarea finală la un interval de patru ore, utilizatorii sunt încurajați să păstreze ochii într-un fixator adecvat (de exemplu, formol neutru tamponat) pentru un potențial examen histopatologic [a se vedea punctul 14 și referința bibliografică (8) pentru detalii].

Inflamarea corneană se determină prin măsurarea grosimii corneene efectuată cu ajutorul unui pahimetru cornean, atașat unui microscop cu lampă cu fantă. Aceasta se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor grosimii corneene conform formulei următoare:

$$\left(\frac{\textit{grosimea corneană la momentul} - \textit{grosimea corneană la momentul} = 0}{\textit{grosimea corneană la momentul} = 0} \right) \times 100$$

Valoarea procentuală medie a inflamării corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului maxim mediu al inflamării corneene, obținut în oricare dintre momentele de observare, se furnizează apoi punctajul general al categoriei pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

Opacitatea corneană este evaluată prin utilizarea pentru înregistrare a suprafeței corneei care este cea mai opacifiată, astfel cum se arată în tabelul 1. Valoarea medie a opacității corneene pentru toți ochii testați se calculează pentru toate momentele de observare. Pe baza punctajului mediu maxim al opacității corneene obținut în oricare dintre momentele de observare, se furnizează apoi un punctaj general al categoriei pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

▼M7

Tabelul 1.

Punctajele opacității corneene

Punctaj	Observații
0	Absența opacității
0,5	Opacitate redusă
1	Zone dispersate sau difuze; detaliile irisului sunt vizibile în mod clar
2	Zone translucide ușor sesizabile; detaliile irisului sunt ușor neclare
3	Opacitate corneană severă; nu sunt vizibile anumite detalii ale irisului; dimensiunea pupilei este foarte puțin sesizabilă
4	Opacitate corneană completă; iris invizibil

Retenția de fluoresceină este evaluată numai pentru momentul de observare după 30 de minute, astfel cum se arată în tabelul 2. Valoarea medie a retenției de fluoresceină pentru toți ochii testați se calculează în consecință pentru momentul de observare după 30 de minute și este utilizată pentru punctajul general al categoriei furnizat pentru fiecare substanță chimică de testat (a se vedea punctul 51).

Tabelul 2.

Punctajele de retenție de fluoresceină.

Punctaj	Observații
0	Absența retenției de fluoresceină
0,5	Colorare redusă a unor celule izolate
1	Colorare a unor celule izolate dispersate pe zona tratată a corneei
2	Colorare intensă focalizată sau confluentă a unor celule izolate
3	Zone confluente întinse ale corneei care reține fluoresceină

Efectele morfologice includ „corodarea” celulelor epiteliale corneene, „detașarea” epiteliului, „formarea de asperități” la nivelul suprafeței corneene și „aderarea” de cornee a substanței chimice de testat. Aceste rezultate pot varia în gravitate și se pot produce în mod simultan. Clasificarea rezultatelor este subiectivă în funcție de interpretarea formulată de cercetător.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

Rezultatele pentru opacitatea corneană, inflamarea corneei și reținerea de fluoresceină se evaluează separat pentru a genera o clasă ICE pentru fiecare caracteristică. Clasele ICE pentru fiecare caracteristică sunt combinate ulterior pentru a genera o clasificare a iritației oculare pentru fiecare substanță chimică de testat.

Criterii de decizie

După evaluarea fiecărei caracteristici, se pot desemna clasele ICE în funcție de un interval predeterminat. Interpretarea inflamării corneene (tabelul 3), a opacității (tabelul 4) și a retenției de fluoresceină (tabelul 5) utilizând patru clase ICE se realizează în conformitate cu scalele prezentate mai jos. Este important să se remarce faptul că punctajele pentru inflamarea corneană prezentate în tabelul 3 sunt aplicabile numai în cazul în care grosimea se

▼M7

măsoară cu un microscop cu lampă cu fantă (de exemplu, Haag-Streit BP900) cu dispozitivul de măsurare a adâncimii nr. 1 și cu lărgimea fantei setată la $9\frac{1}{2}$, respectiv egală cu 0,095 mm. Utilizatorii trebuie să aibă în vedere faptul că microscoapele cu lampă cu fantă pot produce rezultate diferite ale grosimii corneei dacă lărgimea fantei microscopului este diferită.

Tabelul 3

Criteriile de clasificare a ICE pentru inflamarea corneeană.

Inflamarea corneană medie (%) (*)	Clasa ICE
De la 0 la 5	I
> 5 până la 12	II
> 12 până la 18 (> 75 min după tratament)	II
> 12 până la 18 (≤ 75 min după tratament)	III
> 18 până la 26	III
> 26 până la 32 (> 75 min după tratament)	III
> 26 până la 32 (≤ 75 min după tratament)	IV
> 32	IV

(*) Cel mai mare punctaj mediu observat în orice moment

Tabelul 4

Criteriile de clasificare a ICE pentru opacitate.

Punctajul maxim mediu pentru opacitate (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Punctaj mediu maxim observat în orice moment (pe baza punctajelor opacității astfel cum sunt definite în tabelul 1).

Tabelul 5

Criteriile de clasificare a ICE pentru retenția de fluoresceină

Punctaj mediu al retenției de fluoresceină la 30 de minute post-tratament (*)	Clasa ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Pe baza punctajelor astfel cum sunt definite în tabelul 2.

Clasificarea *in vitro* pentru o substanță chimică de testat este evaluată prin interpretarea clasificării GHS care corespunde combinării categoriilor obținute pentru inflamarea corneană, opacitatea corneană și retenția de fluoresceină, astfel cum este descrisă în tabelul 6.

▼M7

Tabelul 6

Clasificări generale *in vitro*

Clasificare GHS al ONU	Combinații ale celor 3 caracteristici
Nicio categorie	3 × I 2 × I, 1 × II
Nu se poate estima	Alte combinații
Categoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacitatea corneană ≥ 3 la 30 min (pentru cel puțin 2 ochi) Opacitatea corneană = 4 în orice moment (pentru cel puțin 2 ochi) Detașarea severă a epiteliului (pentru cel puțin 1 ochi)

(*) Combinații a căror probabilitate de apariție este mai mică.

Criterii de acceptare a studiului

Un test este considerat acceptabil în cazul în care martorul negativ testat în paralel sau grupul martor solvent/vehicul și martorii pozitivi testați în paralel sunt identificați ca neclasificat conform GHS și, respectiv, categoria 1 a GHS.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații, dacă acestea prezintă relevanță pentru desfășurarea studiului:

Substanță chimică de testat și substanțele chimice martor

— Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de către Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

— Numărul de înregistrare (Registry Number – RN) CAS, dacă se cunoaşte;

— Puritatea și compoziția substanțelor chimice de testat/martor (în procent(e) de greutate], în măsura în care informația respectivă este disponibilă;

— Proprietăți fizico-chimice precum starea fizică, pH-ul, stabilitatea, hidrosolubilitatea, utile pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Stabilitatea, dacă este cunoscută.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— Identificarea sursei ochilor (de exemplu, unitatea unde au fost colectați);

Condițiile metodei de testare

— Descrierea sistemului de testare utilizat;

▼M7

— Microscopul cu lampă cu fantă utilizat (de exemplu, modelul) și reglajele instrumentelor pentru microscopul cu lampă cu fantă utilizat;

— Trimitere la rezultate ale martorilor negativi și pozitivi testați anteriori, dacă este cazul, date anterioare care atestă intervale acceptabile pentru martorii etalon testați în paralel;

— Procedura utilizată pentru a asigura integritatea (și anume, precizia și fiabilitatea) metodei de testare în timp (de exemplu, testarea periodică a substanțelor chimice de verificare).

Colectarea și pregătirea ochilor

— Vârsta și greutatea animalului donator și, dacă sunt disponibile, caracteristicile specifice ale animalelor de la care au fost colectați ochii (de exemplu, sexul, șușă);

— Condițiile de depozitare și de transport ale ochilor (de exemplu, data și ora colectării ochilor, perioada de timp dintre colectarea capetelor și introducerea ochilor enucleați în camera de suprafuziune);

— Pregătirea și montarea ochilor, inclusiv specificații privind calitatea acestora, temperatura camerelor ochilor și criteriile de selecție pentru ochii utilizați pentru testare.

Procedura de testare

— Numărul de duplicate utilizate;

— Identitatea martorilor pozitivi și negativi utilizați (dacă este cazul, de asemenea, a solventului și a martorilor etalon);

— Doza de substanță chimică de testat, aplicarea și timpul de expunere;

— Momentele de observare (înainte și după tratament);

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea în formă tabelară a punctajelor de inflamare corneană, opacitate și retenție de fluoresceină obținute pentru fiecare ochi și la fiecare dintre momentele de observație, inclusiv punctaje medii în fiecare moment de observare a tuturor ochilor testați;

— Punctajele medii maxime de inflamare corneană, opacitate și retenție de fluoresceină observate (de la orice moment), precum și clasa ICE corespunzătoare.

— Descrierea oricăror altor efecte observate;

— Clasificare GHS *in vitro* derivată;

— După caz, fotografii ale ochiului;

Discutarea rezultatelor

Concluzie

▼**M7**

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibil la: http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(3) ICCVAM (2010)- ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 107553A. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on „The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants". Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibil la: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.*31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13p. Disponibil la: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibil la: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.*36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică etalon: O substanță chimică utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță chimică etalon trebuie să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă(e) și sigură(e); (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe chimice testată; (iii) caracteristici fizicochimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Cornee: Regiunea transparentă a părții anterioare a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite luminii să pătrundă în interior.

Opacitate corneană: Măsurarea gradului de opacitate a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Opacitatea corneană crescută este un indicator al leziunii corneene.

Inflamare corneană: O măsurare obiectivă în testul ICE a gradului de dilatare a corneei după expunerea la o substanță chimică de testat. Se exprimă sub formă procentuală și se calculează pe baza măsurătorilor nivelului de bază al grosimii corneene (pre-doză) și ale grosimii înregistrate la intervale regulate după expunere la substanța chimică testată prin testul ICE. Gradul de inflamare corneană este un indicator al leziunii corneene.

Iritație oculară: Producerea de modificări în ochi în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochilor” și cu „categoria 2 din GHS al ONU” (4).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Retenție de fluoresceină: O măsurare subiectivă în cadrul testului ICE a gradului în care fluoresceina de sodiu este reținută de celulele epiteliale din cornee după expunerea la o substanță de testat. Gradul de retenție de fluoresceină este un indicator al leziunii la nivelul epiteliului cornean.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „lezarea oculară gravă” și „categoria 1 din GHS al ONU”.

▼M7

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe, în care acestea nu intră în reacție (4).

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanță chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

Neclasificat: Substanțe care nu sunt clasificate pentru iritația oculară (categoria 2 din GHS al ONU) sau pentru lezarea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „nicio categorie” din GHS al ONU.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele unui sistem testat și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară” și „categoria 2 din GHS al ONU”.

Lezarea oculară gravă: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu sunt complet reversibile într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochilor” și cu „categoria 1 din GHS al ONU” (4).

Microscop cu lampă cu fantă: Instrument utilizat pentru a examina direct ochiul, sub puterea de mărire a unui microscop binocular, prin crearea unei imagini stereoscopice, drepte. În cazul metodei de testare ICE, acest instrument este utilizat pentru a vizualiza structurile anterioare ale ochiului de pui și pentru a măsura în mod obiectiv grosimea corneană cu ajutorul unui dispozitiv de măsurare a grosimii atașat.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem testat, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu eșantioanele de substanță chimică de testat tratate și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Substanță: Elemente chimice și compușii lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (4).

Surfactant: Denumit, de asemenea, agent cu activitate de suprafață, acesta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate reduce tensiunea superficială a unui lichid și, prin urmare, permite producerea spumei sau pătrunderea substanțelor solide; este cunoscut, de asemenea, ca agent tensioactiv.

▼M7

Abordare descendentă: Abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, o procedură de testare secvențială pe animale se efectuează până în momentul în care se poate efectua o clasificare lipsită de echivoc.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (4).

Categoria 1 din GHS al ONU: a se vedea „lezarea oculară gravă” și/sau „efecte ireversibile asupra ochilor”.

Categoria 2 din GHS al ONU: a se vedea „iritația oculară” și/sau „Efecte reversibile asupra ochilor”.

„Nicio categorie” din GHS a ONU: Substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru clasificare corespunzătoare categoriei 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU. Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

Metodă de testare validată: Metodă de testare pentru care au fost completate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și al fiabilității încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus.

Forța probantă: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a se formula și a se susține o concluzie în ceea ce privește potențialul pericolelor unei substanțe chimice de testat.

▼M7

Apendicele 2

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE ICE

Înainte de utilizarea sistematică a unei metode de testare conforme cu prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării pericolelor la nivelul celor 13 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele la nivel ocular pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) și sistemul de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau „nicio categorie”) (4) (6). Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, existența datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor de calitate superioară furnizate de metoda de testare *in vitro* ICE. Informațiile de referință sunt disponibile în registrul SSD (3) și în documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general pentru metoda de testare ICE (9).

Tabelul 1

Substanțe chimice recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda ICE

Substanță chimică	NR: CAS	Clasă chimică (1)	Forma fizică	Clasificare *In Vivo* (2)	Clasificare *In Vitro* (3)
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorhexidină	55-56-1	Amină, amidină	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid dibenzoil-L-tartric	2743-38-6	Acid carboxilic, ester	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Imidazol	288-32-4	Heterociclu	Solid	Categoria 1	Categoria 1
Acid tricloracetic (30 %)	76-03-9	Acid carboxilic	Lichid	Categoria 1	Categoria 1
Clorură de 2,6-diclor-benzoil	4659-45-4	Halogenură de acil	Lichid	Categoria 2A	Nu se poate estima (4)
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2A (5)	Nu se poate estima (4)
Etil-2-metil-acetoacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2B	Nu se poate estima (4)
Dimetil sulfoxid	67-68-5	Compuși organici cu sulf	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie
Glicerină	56-81-5	Alcool	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie (limită)
Metilciclopentan	96-37-7	Hidrocarburi (ciclice)	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie
N-hexan	110-54-3	Hidrocarbură (aciclică)	Lichid	Nicio categorie	Nicio categorie

▼**M7**

Substanță chimică	NR: CAS	Clasă chimică ([1])	Forma fizică	Clasificare *In Vivo* ([2])	Clasificare *In Vitro* ([3])
Triacetină	102-76-1	Lipide	Lichid	Neclasificat	Nicio categorie

Abrevieri: NR: CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service.

([1]) Clasele chimice au fost desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la http//www.nlm.nih.gov/mesh)

([2]) Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405) și prin utilizarea GHS al ONU (4) (6).

([3]) Pe baza rezultatelor obținute prin metoda ICE, astfel cum este descris în tabelul 6.

([4]) Combinații ale punctajelor metodei ICE, altele decât cele descrise în tabelul 6 pentru identificarea categoriei „nicio categorie” din GHS al ONU și categoria 1 din GHS al ONU (a se vedea tabelul 6).

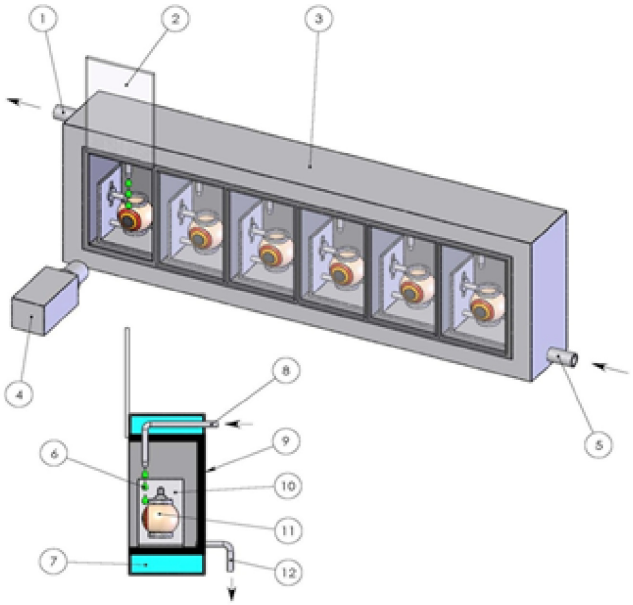
([5]) Clasificarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 1 din 3 versus 2 din 3 animale, cu efecte din ziua 7, necesar pentru a se efectua o clasificare în categoria 2A. Studiu *in vivo* a inclus 3 de animale. Toți parametri studiați, cu excepția roșeții conjunctivei la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua 7 a avut un punctaj de roșeață a conjunctivei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în termen de 10 de zile.

▼M7

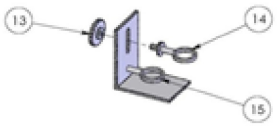
Apendicele 3

DIAGRAME ALE APARATULUI DE SUPRAFUZIUNE ICE ȘI ALE CLEMELOR PENTRU OCHI

[A se vedea Burton et al. (18) pentru descrieri generice suplimentare ale aparatului de suprafuziune și ale clemelor pentru ochi]



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nr. crt.	Descriere	Nr. crt.	Descriere
1	Evacuare apă caldă	9	Compartiment
2	Ușă glisantă	10	Suport ochi
3	Aparat de suprafuziune	11	Ochi de pui
4	Instrument de măsurare optică	12	Evacuare soluție salină
5	Admisie apă caldă	13	Șurub fixare
6	Soluții salină	14	Braț superior ajustabil
7	Apă caldă	15	Braț inferior fix
8	Admisie soluție salină		

▼M7

B.49. TESTUL *IN VITRO* DE MICRONUCLEU PE CELULE DE MAMIFERE

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 487 (2016). Aceasta face parte dintr-o serie de metode de testare privind toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (1) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Testul *in vitro* de micronucleu (MNvit) este un test de genotoxicitate pentru identificarea micronucleelor (MN) în citoplasma celulelor în interfază. Micronucleele pot avea ca origine fragmente de cromozomi acentrici (și anume, fără centrometru) sau cromozomi integrali incapabili să migreze către polii celulei în timpul etapei de anafază a divizării celulare. Prin urmare, testul MNvit este o metodă *in vitro* care constituie un instrument de bază complet pentru investigarea potențialului de leziuni cromozomiale *in vitro* datorită capacității acestuia de evidențiere a agenților aneugeni și clastogeni (2) (3) în celulele care au efectuat diviziune celulară în timpul sau după expunerea la substanța chimică de testat (a se vedea punctul 13 pentru mai multe detalii). Micronucleele reprezintă leziunile transmise celulelor fiice, în timp ce aberațiile cromozomiale observate în celulele aflate în metafază pot să nu fie transmise. În ambele cazuri, modificările pot să nu fie compatibile cu supraviețuirea celulelor.

Această metodă de testare permite utilizarea de protocoale incluzând sau nu citocalasină B (citoB), inhibitorul de polimerizare a actinei. Adăugarea de citoB anterior mitozei are ca rezultat celule care sunt binucleate și, prin urmare, permite identificarea și analiza micronucleelor doar în acele celule care au încheiat procesul de mitoză (4) (5). Această metodă de testare permite, de asemenea, utilizarea de protocoale fără blocarea citocinezei, cu condiția existenței posibilității de a demonstra faptul că populația celulară analizată a efectuat mitoza.

În plus față de utilizarea testului MNvit pentru a identifica substanțele chimice care induc micronuclee, utilizarea marcării imunochimice a kinetocorilor sau hibridizarea cu sonde centrometrice/telomerice (hibridizarea *in situ* cu flourescență (FISH) poate, de asemenea, să furnizeze informații suplimentare cu privire la mecanismele care stau la originea leziunilor cromozomiale și ale formării micronucleelor (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Procedurile de marcare și de hibridizare menționate pot fi utilizate atunci când se constată o creștere a formării de micronuclee, iar cercetătorul dorește să stabilească dacă respectiva creștere este rezultatul unor evenimente clastogenice și/sau aneugene.

Deoarece micronucleele prezente în celulele în interfază pot fi evaluate în mod relativ obiectiv, personalul laboratorului trebuie doar să determine numărul de celule binucleate atunci când se utilizează citoB și incidența celulelor micronucleate în toate cazurile. Prin urmare, lamele pot fi examinate relativ rapid, iar analiza poate fi automatizată. Acest lucru permite examinarea a mii în loc de sute de celule pentru fiecare tratament, mărind astfel puterea testului. În sfârșit, având în vedere faptul că micronucleele pot să provină de la cromozomi întârziați, există posibilitatea detectării agenților care induc aneoploidie care sunt dificil de studiat în cadrul testelor de aberații cromozomiale clasice, de exemplu, capitolul B.10 din prezenta anexă (18). Cu toate acestea, testul MNvit astfel cum este descris în prezenta metodă de testare nu permite diferențierea între substanțe chimice care provoacă modificări în numărul de cromozomi și/sau ploidie și substanțele care provoacă clastogenicitate fără utilizarea de tehnici speciale precum metoda FISH menționată la punctul 4.

Testul MNvit este fiabil și poate fi efectuat pe o diversitate de tipuri de celule, în prezența sau absența citoB. Validitatea testului MNvit este atestată de numeroase date obținute utilizând diferite tipuri de celule (culturi de linii celulare sau culturi de celule primare) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Acestea includ, în special, studii internaționale de validare coordonate de Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) și rapoartele elaborate de International Workshop on

▼M7

Genotoxicity Testing (5) (17). De asemenea, datele disponibile au făcut obiectul unei noi evaluări în cadrul unui studiu de validare retrospectiv fondat pe forța probantă, efectuat de Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM) al Comisiei Europene, iar metoda de testare a fost declarată valabilă din punct de vedere științific de către Comitetul științific consultativ al ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

Testul MNvit pe celule de mamifere poate să utilizeze culturi de linii celulare sau culturi de celule primare, de origine umană sau de la rozătoare. Deoarece frecvența de fond a micronucleelor va influența sensibilitatea testului, se recomandă utilizarea unor tipuri de celule cu o frecvență de fond stabilă și definită de formare de micronucleu. Celulele utilizate se selectează în funcție de capacitatea acestora de a se dezvolta în mod optim în cultură, de stabilitatea cariotipului acestora (inclusiv numărul de cromozomi) și frecvența spontană a micronucleelor (40). În prezent, datele disponibile nu permit efectuarea de recomandări ferme, dar sugerează faptul că este important, atunci când se evaluează pericolele chimice, să se ia în considerare statutul *p53*, stabilitatea genetică (a cariotipului), capacitatea de regenerare a ADN-ului și originea (rozătoare *versus* celule umane) celulelor alese pentru testare. Utilizatorii acestei metode de testare sunt încurajați, prin urmare, să ia în considerare influența acestor și altor caracteristici ale celulelor privind detectarea unei linii celulare a inducției de micronuclee, având în vedere faptul că cunoștințele evoluează în acest domeniu.

Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testele efectuate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care celulele sunt competente din punct de vedere metabolic cu substanțele chimice de testat. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*. Se acordă atenție deosebită evitării condițiilor care ar conduce la rezultate pozitive date de artefacte care nu reflectă genotoxicitatea substanțelor chimice de testat. Aceste condiții includ modificările de pH (41) (42) (43) sau osmolalitate, interacțiunea cu mediul culturii de celule (44) (45) sau niveluri excesive ale citotoxicității (a se vedea punctul 29).

Pentru a analiza inducția micronucleelor, este esențial ca mitoza să se fi produs atât în culturile tratate, cât și în cele netratate. Cea mai prolifică etapă în materie de date în ceea ce privește examinarea micronucleelor este în celulele care au încheiat o mitoză în timpul sau ulterior tratamentului cu substanța chimică de testat. Pentru nanomaterialele fabricate, sunt neceare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar acestea nu sunt descrise în prezenta metodă de testare.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare în cazul în care există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

Culturi de celule umane sau de altă origine mamiferă sunt expuse la substanța chimică de testat în prezența și în absența unei surse exogene de activare metabolică, cu excepția cazului în care sunt utilizate celule cu capacitate metabolică adecvată (a se vedea punctul 19).

În timpul și după expunerea la substanța chimică de testat, celulele se cultivă pentru o perioadă suficientă pentru a permite leziunii cromozomiale sau altor efecte asupra ciclului celular/diviziunii celulare să conducă la formarea de micronuclee în celule în interfază. Pentru inducția aneuploidiei, substanța chimică de testat trebuie în general să fie prezentă în timpul mitozei. Celulele recoltate și colorate în interfază sunt analizate pentru a detecta prezența micronucleelor. În mod ideal, examinarea micronucleelor se realizează în acele celule care au efectuat o mitoză completă în timpul expunerii la substanța chimică de testat

▼M7

sau în timpul perioadei post-tratament, dacă aceasta este prevăzută în cadrul metodei. În culturile care au fost tratate cu un agent de blocare a citocinezei, acest lucru este ușor de realizat prin examinarea doar a celulelor binucleate. În absența unui agent de blocare a citocinezei, este important să se demonstreze că celulele analizate au efectuat cel mai probabil diviziunea celulară, pe baza unei creșteri a populației de celule, în timpul sau după expunerea la substanța chimică de testat. Pentru toate protocoalele, este important să se demonstreze că proliferarea celulară a avut loc atât în culturile tratate, cât și în cele martor, iar gradul de citotoxicitate sau citostază indus de substanța chimică de testat este evaluat pentru toate culturile în care se realizează examinarea micronucleelor.

DESCRIEREA METODEI

Celule

În cadrul testului pot fi utilizate limfocite primare din sânge periferic uman sau de la alte mamifere în cultură (7) (20) (46) (47) și mai multe linii celulare provenite de la rozătoare precum CHO, V79, CHL/IU și celule L5178Y sau linii celulare umane, precum TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (a se vedea punctul 6). Alte linii celulare, cum ar fi HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), celule HepG2 (52), A549 (53) și celule embrionare primare de hamster sirian (54) au fost utilizate pentru testarea de micronucleu, dar până la acest moment nu au fost validate în mod extensiv. Prin urmare, utilizarea linii și tipurilor de celule respective trebuie justificată pe baza performanței demonstrate în cadrul testului, astfel cum este descrisă în secțiunea referitoare la criteriile de acceptabilitate. CitoB a fost raportată ca având un potențial impact asupra creșterii celulelor L5178Y și, prin urmare, nu este recomandată cu această linie de celule (23). În cazul în care se utilizează celule primare, din motive de bunăstare a animalelor, se ia în considerare utilizarea de celule de origine umană atunci când este fezabil și de la care s-au prelevat probe în conformitate cu principiile și reglementările eticii umane.

Limfocitele din sângele periferic uman se obțin de la indivizi tineri (aproximativ 18-35 de ani), nefumători, fără vreo boală cunoscută sau expuneri recente la agenți genotoxici (de exemplu, substanțe chimice, radiații ionizante) la niveluri care ar conduce la creșterea incidenței generale a celulelor micronucleate. Acest lucru ar asigura ca incidența generală a celulelor micronucleate să fie scăzută și consistentă. Incidența de bază a celulelor micronucleate crește odată cu vârsta, iar această tendință este mai marcantă la femei decât la bărbați (55). În cazul în care celulele provenite de la mai mulți donatori sunt reunite pentru utilizare, se precizează numărul de donatori. Este necesar să se demonstreze că celulele s-au divizat de la începutul tratării cu substanța chimică de testat în celule prelevate. Culturile de celule sunt menținute în faza de creștere exponențială (linii celulare) sau sunt stimulate să se dividă (culturi primare de limfocite) pentru a expune celulele în diferite etape ale ciclului celular, având în vedere faptul că sensibilitatea etapelor celulare la substanțele chimice de testat poate să nu fie cunoscută. Celulele primare care necesită stimulare cu agenți mitogenici pentru a se divide nu mai sunt sincronizate, în general, în timpul expunerii la substanța chimică de testat (de exemplu, limfocite umane după o expunere mitogenică de 48 de ore). Utilizarea de celule sincronizate în timpul tratamentului cu substanța chimică de testat nu este recomandată, dar poate fi acceptabilă dacă este justificată.

Medii și condiții de cultură

Se recomandă utilizarea mediilor de cultură și a condițiilor de incubație (vasele de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO_2, după caz, temperatura de incubație de 37 °C) corespunzătoare pentru a menține culturile. Liniile celulare se verifică în mod regulat pentru stabilitatea numărului modal de cromozomi și absența contaminării cu *micoplasmă* și în cazul în care celulele au fost contaminate sau în cazul în care numărul modal de cromozomi s-a schimbat, acestea nu se utilizează. Se stabilește durata normală a ciclului celular al liniilor celulare sau al culturilor primare utilizate în laboratorul de testare, iar aceasta trebuie să fie conformă cu caracteristicile celulare publicate.

▼M7

Pregătirea culturilor

Linii celulare: celulele se prepară plecând de la culturile de rezervă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie ori în culturile monostrat să continue să crească exponențial până la recoltarea acestora (de exemplu, se evită confluența celulelor care cresc în monostrat).

Limfocite: sângele integral tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină) sau limfocite separate sunt plasate în cultură (de exemplu, de 48 de ore pentru limfocitele umane) în prezența unui mitogen [de exemplu fitohemaglutinină (PHA) pentru limfocitele umane] pentru a induce diviziune celulară anterior expunerii la substanța chimică de testat sau la citoB.

Activare metabolică

Recurgerea la un sistem de activare metabolică exogen este necesară în cazul utilizării de celule dotate cu o capacitate metabolică endogenă inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent, recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, este o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică precum Aroclor 1254 (56) (57) sau un amestec de fenobarbital și b-naftoflavonă (58) (59) (60). Utilizarea celui din urmă amestec nu este contrară prevederilor Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (61) și s-a dovedit a fi la fel de eficientă ca Aroclor 1254 pentru inducția de oxidaze cu funcție mixtă (58) (59) (60). Fracția S9 este utilizată în general cu o concentrație cuprinsă între 1-2 % (v/v), dar poate fi majorată la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Utilizarea de produse care reduc indicele mitotic, în special produsele de complexare cu calciu (62), se evită în timpul tratamentului. Alegerea tipului și concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice testată.

Prepararea substanței chimice de testat

Substanțele chimice de testat în stare solidă se pregătesc în solvenți adecvați și se diluează, dacă este cazul, anterior tratamentului aplicat celulelor. Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Substanțele chimice de testat în stare gazoasă sau cele volatile se testează prin modificare adecvată a protocoalelor standard, de exemplu utilizarea de recipiente închise ermetic (63) (64) (65). Pregătirea de preparate de substanța chimică de testat se efectuează anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în condiții de stocare.

Condiții de testare

Solvenți

Solventul se alege astfel încât să optimizeze solubilitatea substanței chimice de testat fără să afecteze desfășurarea testului, și anume, să modifice creșterea celulară, să afecteze integritatea substanței chimice de testat, să reacționeze cu vasele de cultură, să afecteze sistemul de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau un mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt apa sau dimetilsulfoxidul (DMSO). În general, solvenții organici nu trebuie să depășească 1 % (v/v). În cazul în care citoB se dizolvă în DMSO, cantitatea totală de solvent organic utilizat atât pentru substanța chimică de testat, cât și pentru citoB nu trebuie să depășească 1 % (v/v); în caz contrar, se utilizează martori netratați pentru a asigura ca procentajul de solvent organic nu are efecte adverse. Solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu trebuie să depășească 10 % (v/v) în mediul de tratament final. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora se justifică prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanța chimică de testat, cu sistemul de

▼M7

testatare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa acestor date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1), precum și martori solvenți pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau cromozomiale (de exemplu, aneuploidie sau clastogenicitate).

Utilizarea de citoB ca agent de blocare a citocinezei

Unul dintre cele mai importante aspecte în efectuarea testului MNvit este garantarea faptului că celulele examinate au încheiat procesul de mitoză în timpul tratamentului sau în timpul perioadei de incubație post-tratament, dacă aceasta este prevăzută în cadrul metodei. Prin urmare, examinarea micronucleului se limitează la celulele care au fost supuse procesului de mitoză în timpul sau ulterior tratamentului. CitoB este agentul utilizat cel mai frecvent pentru blocarea citocinezei deoarece inhibă asamblarea actinei împiedicând astfel separarea celulelor fiice după mitoză, conducând la formarea de celule binucleate (6) (66) (67). Efectul substanței chimice de testat asupra cineticii proliferării celulare poate fi măsurat concomitent atunci când se utilizează citoB. CitoB se utilizează ca agent de blocare a citocinezei atunci când sunt utilizate limfocite umane, deoarece durata ciclului celular este variabilă în funcție de donatori și pentru că nu toate limfocitele reacționează la stimularea cu PHA. Utilizarea de ciroB nu este obligatorie pentru alte tipuri de celule în cazul în care se poate demonstra că acestea au efectuat diviziunea astfel cum este descris la punctul 27. În plus, citoB nu este utilizată, în general, atunci când sunt evaluate probele de micronuclee utilizând metode citometrice de flux.

Pentru fiecare tip de celulă, laboratorul determină concentrația adecvată de citoB pentru a obține frecvența optimală de celule binucleate în culturile martor tratate cu solvent și dovedește capacitatea acesteia de a produce suficiente celule binucleate pentru examinare. Concentrația adecvată de citoB este cuprinsă, în general, între 3 și 6 μg/ml (19).

Măsurarea proliferării celulare și a citotoxicității și alegerea concentrațiilor de tratament

În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, se evită concentrațiile susceptibile să producă răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 29), precipitate în mediul de cultură (a se vedea punctul 30) sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 9). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă în pH-ului mediului în timpul adăugării sale, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

Măsurători ale proliferării celulare se efectuează pentru a asigura că un număr suficient de celule tratate au efectuat mitoză în timpul testului și că tratamentele sunt realizate la niveluri adecvate de citotoxicitate (a se vedea punctul 29). Citotoxicitatea se determină în experimentul principal, cu sau fără activare metabolică, utilizând un indicator corespunzător de moarte și creștere celulară (a se vedea punctele 26 și 27). În timp ce evaluarea citotoxicității pe un prim test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, un test inițial nu este obligatoriu. În cazul în care este efectuat, acesta nu trebuie să înlocuiască măsurarea citotoxicității în experimentul principal.

Tratarea culturilor cu citoB și măsurarea frecvențelor relative ale celulelor mononucleate, binucleate și multinucleate în fiecare cultură furnizează o metodă precisă de cuantificare a efectului unui tratament asupra proliferării celulare și asupra activității citotoxice sau citostatice (6) și asigură luarea în calcul doar a celulelor care s-au divizat în timpul tratamentului sau după acesta. Indicele de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) (6) (27) (68) sau

▼M7

indicele de replicație (RI) de la cel puțin 500 de celule pentru fiecare cultură (a se vedea formulele din apendicele 2) sunt recomandate pentru estimarea activității citotoxice și citostatice ale unui tratament prin compararea valorilor obținute pentru culturile tratate și cele martor. Evaluarea altor indicatori de citotoxicitate (de exemplu, integritatea celulară, apoptoză, necroză, numărarea celulelor în metafază, ciclul celular) poate furniza informații utile, dar nu trebuie să înlocuiască CBPI sau RI.

În studiile fără citoB este necesar să se demonstreze că celulele în culturi s-au divizat, astfel încât o parte substanțială din celule examinate au efectuat diviziunea în timpul sau ulterior tratamentului cu substanța chimică de testat, în caz contrar existând riscul de producere a unor răspunsuri fals negative. Măsurarea dublării relative a populației (RPD) sau a creșterii relative a numărului de celule (RICC) se recomandă pentru estimarea activității citotoxice și citostatice a unui tratament (17) (68) (69) (70) (71) (a se vedea formulele din apendicele 2). În perioade de prelevare extinse (de exemplu, tratamente de 1,5-2 ori durata ciclului celular normal și recoltare după un ciclu celular normal de 1,52 ori suplimentar, conducând la perioade de prelevare mai mari cu de 3-4 ori durata ciclului celular normal în total, astfel cum sunt descrise la punctele 38 și 39), RPD ar putea subestima citotoxicitatea (71). În aceste circumstanțe, RICC ar putea fi o măsură mai potrivită sau evaluarea citotoxicității după o perioadă de 1,5-2 ori durata ciclului celular normal ar fi o estimare utilă. Evaluarea altor markeri de citotoxitate sau citostază (de exemplu, integritatea celulară, apoptoză, necroză, numărarea celulelor în metafază, indicele de proliferare (PI), ciclul celular, punțile nucleoplasmice sau mugurii nucleari) ar putea furniza informații suplimentare utile, dar nu trebuie să înlocuiască nici RPD, nici RICC.

Se evaluează cel puțin trei concentrații de testat (fără a include martorii solvent și pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Indiferent de tipurile de celule (linii celulare sau culturi primare de limfocite), fiecare concentrație se poate testa fie pe culturi replicate tratate, fie pe culturi unice tratate. În timp ce utilizarea a două culturi tratate este recomandată, culturile unice sunt acceptabile, de asemenea, cu condiția ca același număr total de celule să fie examinat atât pentru culturi unice, cât și pentru culturi duplicat. Utilizarea de culturi unice este deosebit de relevantă atunci când se evaluează mai mult de 3 concentrații (a se vedea punctele 44-45). Rezultatele obținute din culturi replici independente la o anumită concentrație pot fi reunite în vederea analizei datelor. În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. În prezența citotoxicității, concentrațiile de testat selectate trebuie să acopere o plajă de valori de la producerea citotoxicității astfel cum este descris la punctul 29 și să includă concentrații la care există citotoxicitate moderată și ușoară sau nu există citotoxicitate. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante puternice, iar pentru a obține date la un nivel scăzut și moderat de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația doză-răspuns, va fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și/sau mai mult de trei concentrații (culturi unice sau replici), în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 60).

În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație trebuie să vizeze atingerea unui nivel de citotoxicitate 55 ± 5 % utilizând parametrii de citotoxicitate recomandați (și anume, reducerea RICC și RPD pentru linii celulare atunci când nu se utilizează citoB și reducerea CBPI sau RI atunci când se utilizează citoB la 45 ± 5 % a martorului negativ testat în paralel) (72). Se acordă atenție deosebită interpretării rezultatelor pozitive care se găsesc numai la limita superioară a acestei plaje de valori de toxicitate de 55 ± 5 % (71).

▼M7

În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă se manifestă citototoxicitate la un nivel sub concentrația minimă de insolubilitate, se recomandă testarea la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece pot rezulta efecte date de artefacte din precipitat. La concentrația care produce un precipitat, se acordă atenție deosebită pentru a asigura că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului (de exemplu, colorare sau examinare). Determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment poate fi utilă.

În cazul în care nu se constată citotoxicitate sau precipitat, concentrația maximă de testare trebuie să corespundă cu 10 mM, 2 mg/ml sau 2 µl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (73) (74) (75). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materii biologice (UVCB) (76), extract de mediu etc., concentrația maximă ar trebui să fie mai mare (de exemplu, 5 mg/ml) în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecărei componente. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (93).

Martori

La fiecare moment de recoltare se includ martori negativi testați în paralel (a se vedea punctul 21) constituiți dintr-un solvent singur în mediul de tratare și care se tratează în aceleași condiții precum culturile de tratare.

Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra abilitatea laboratorului în identificarea substanțelor clastogene și aneugene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică (după caz). Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Alte substanțe chimice martor pozitive pot fi utilizate, dacă acest lucru este justificat.

În prezent, niciun aneugen cunoscut nu necesită activare metabolică pentru a prezenta activitate genotoxică (17). Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate pentru tratamentele pe termen scurt efectuate concomitent cu și fără activare metabolică utilizând aceeași durată de tratament, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un clastogen care necesită activare metabolică. În acest caz, un singur rezultat clastogenic al martorului pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de reacție a sistemului de testare. Cu toate acestea, tratamentul de lungă durată (fără S9) necesită propriul martor pozitiv deoarece durata tratamentului va fi diferită față de testul care utilizează activare metabolică. În cazul în care un clastogen este selectat ca unicul martor pozitiv pentru tratamentul pe termen scurt cu și fără activare metabolică, se selectează un aneugen pentru tratamentul pe termen lung fără activare metabolică. Martorii pozitivi atât pentru clastogenitate, cât și pentru aneugenitate se utilizează pentru celulele competente din punct de vedere metabolic care nu necesită S9.

Fiecare martor pozitiv se utilizează în una sau mai multe concentrații susceptibile să determine creșteri reproductibile și detectabile ale frecvenței de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare (și anume, efectele sunt clare, dar nu dezvăluie imediat examinatorului identitatea lamelor codate) și rezultatul nu trebuie să fie compromis de citotoxicitatea care depășește limitele specificate în prezenta metoda de testare.

▼M7

Tabelul 1.

Substanțe chimice de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Categorie	Substanță chimică	NR. CAS
1. **Clastogeni activi fără activare metabolică**		
	Metansulfonat de metil	66-27-3
	Mitomicină C	50-07-7
	4-nitrochinolină-N oxid	56-57-5
	Cistozină arabinozidă	147-94-4
2. **Clastogeni care necesită activare metabolică**		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciclofosfamidă	50-18-0
3. **Aneugeni**		
	Colchicină	64-86-8
	Vinblastină	143-67-9

PROCEDURĂ

Schema de tratament

Pentru a maximiza probabilitatea detectării unei acțiuni aneugene sau clastogene într-un stadiu specific al ciclului celular, este important ca un număr suficient de celule reprezentând toate etapele diferite ale ciclului celular să fie tratate cu substanța chimică de testat. Toate tratamentele trebuie să înceapă și să se încheie în timpul etapei de creștere exponențială a celulelor, iar celulele trebuie să continue să crească până la momentul prelevării de probe. Schema de tratament pentru liniile celulare și culturile de celule primare poate, prin urmare, să difere într-o oarecare măsură de cea pentru limfocite, care necesită stimulare mitogenică pentru a începe ciclul celular (17). În cazul limfocitelor, cea mai eficientă abordare constă în inițierea tratamentului cu substanța chimică de testat la 44-48 de ore după stimularea cu PHA, atunci când celulele se vor împărți asincron (6).

Datele publicate (19) indică faptul că majoritatea substanțelor aneugene și clastogene sunt detectate în urma unui tratament de scurtă durată, de 3 până la 6 ore, în prezența și în absența preparatului S9, urmat de îndepărtarea substanței chimice de testat și prelevarea de probe la un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (7).

Cu toate acestea, pentru o evaluare aprofundată, care ar fi necesară pentru a încheia un rezultat negativ, toate cele trei condiții experimentale de mai jos se efectuează utilizând atât un tratament pe termen scurt cu și fără activare metabolică, cât și un tratament pe termen lung fără activare metabolică (a se vedea punctele 56, 57 și 58):

— Se recomandă expunerea celulelor la substanța chimică de testat fără activare metabolică, timp de 3-6 ore și prelevarea de probe după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (19),

— Se recomandă expunerea celulelor la substanța de testat în prezența activării metabolice, timp de 3-6 ore, și prelevarea de probe după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului (19),

▼M7

— Celulele se expun continuu fără activare metabolică până în momentul prelevării probelor după un timp echivalent cu aproximativ de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal.

În cazul în care oricare dintre condițiile experimentale de mai sus conduce la un rezultat pozitiv, se poate să nu fie necesar să se investigheze niciun alt regim de tratament dintre celelalte.

În cazul în care se cunoaște sau se presupune că substanța chimică de testat afectează durata ciclului celular (de exemplu, dacă se testează nucleotide analoage), în special pentru celule competente cu p53 (35) (36) (77), perioadele de prelevare sau recuperare pot fi extinse cu o perioadă suplimentară de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal (și anume, totalul de 3,0 până la 4,0 ori durata ciclului celular după inițierea tratamentelor pe termen scurt și pe termen lung). Aceste opțiuni vizează situațiile în care pot exista preocupări referitoare la posibilele interacțiuni dintre substanța chimică de testat și citoB. În cazul în care se utilizează perioade extinse de prelevare (și anume, timp total de cultură de 3,0 până la 4,0 ori durata ciclului celular), se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că celulele sunt încă în diviziune activă. De exemplu, în cazul limfocitelor, creșterea exponențială poate să intre în declin la 96 de ore după stimulare și culturile monostrat de celule ar putea deveni confluente.

În tabelul 2 se rezumă schemele de tratament celular propuse. Aceste scheme de tratament generale pot fi modificate (și trebuie justificate) în funcție de stabilitatea sau de reactivitatea substanței chimice de testat sau de caracteristicile de creștere particulare ale celulelor utilizate.

Tabelul 2

Tratamentul celulelor și timpii de recoltă pentru testul MNvit

Limfocite, celule primare și linii celulare tratate cu citoB	+ S9 Tratament de scurtă durată	Se tratează timp de 3-6 ore în prezența S9; se înlătură S9 și mediul de tratare; se adaugă mediu proaspăt și citoB; se recoltează la de 1,5-2,0 ori durata ciclului celular normal de la inițierea tratamentului.
	– S9 Tratament de scurtă durată	Se tratează timp de 3-6 ore; se înlătură mediul de tratare; se adaugă mediu proaspăt și citoB; se recoltează timp de 1,5-2,0 cicluri celulare normale după inițierea tratamentului.
	– S9 Tratament pe perioadă avansată	Se tratează timp de 1,5-2 cicluri celulare normale în prezența citoB; se recoltează la sfârșitul perioadei de tratament.
Linii celulare tratate fără citoB (Schemă de tratament identică cu schemele de tratament descrise mai sus, cu excepția faptului că nu se adaugă citoB)		

Pentru culturile monostrat, celule mitotice (recunoscute după forma rotundă a acestora și după faptul că se detașează de pe suprafață) pot fi prezente la sfârșitul perioadei de tratament de 3-6 ore. Deoarece celulele mitotice se detașează ușor, acestea pot fi pierdute în momentul înlăturării mediului care conține substanța chimică de testat. În cazul în care există dovezi privind o creștere substanțială a numărului de celule mitotice în comparație cu martorii, indicând probabil inhibarea fazei mitotice, celulele se colectează prin centrifugare și se adaugă înapoi la culturi pentru a evita pierderea de celule în mitoză și a celor cu risc de micronuclee/ aberație cromozomială la momentul recoltării.

▼M7

Recoltarea celulelor și pregătirea lamelor

Fiecare cultură se recoltează și se prelucrează în mod separat. Prepararea celulelor poate implica tratament hipotonic, dar această etapă nu este necesară dacă celulele sunt răspândite în mod corespunzător în alt mod. Pot fi utilizate diferite tehnici pentru prepararea lamelor, cu condiția ca preparatele celulare obținute pentru examinare să fie de foarte bună calitate. Celulele cu membrană celulară intactă și cu citoplasmă intactă se păstrează pentru a permite detectarea de micronuclee și (în metoda de blocare a citocinezei) identificarea fiabilă a celulelor binucleate.

Lamele pot fi colorate prin metode diferite precum Giemsa sau coloranți fluorescenți specifici ai ADN. Utilizarea unor coloranți fluorescenți adecvați [de exemplu, oranj de acridină (78) sau Hoechst 33258 plus pironină-Y (79)] poate elimina o parte dintre artefactele asociate utilizării unui colorant nespecifice al ADN. Anticorpii antikinetocori, metoda FISH cu sonde ADN pancentrometrice sau marcarea *in situ* cu ajutorul primerilor pancentrometrici, împreună cu un colorant de contrast al ADN adecvat pot fi utilizați pentru a identifica conținutul (cromozomi întregi vor fi colorați, în timp ce fragmentele de cromozomi acentrici nu vor fi colorați) micronucleelor dacă informațiile de ordin mecanic cu privire la formarea acestora prezintă interes (16) (17). Alte metode de diferențiere a efectelor clastogene și aneugene pot fi utilizate, cu condiția ca eficacitatea acestora să fi fost demonstrată și validată. De exemplu, pentru anumite linii celulare, măsurătorile nucleelor sub 2N ca stări de hipodiploidie utilizând tehnici precum analiza imaginii, citometria cu scanare cu laser sau citometria de flux ar putea, de asemenea, să furnizeze informații utile (80) (81) (82). Observațiile morfologice ale nucleelor ar putea oferi, de asemenea, indicații privind o posibilă aneuploidie. În plus, un test pentru detectarea aberațiilor cromozomiale în metafază, de preferință în același tip de celulă și protocol cu sensibilitate comparabilă, ar putea fi, de asemenea, un instrument util pentru a determina dacă micronucleele sunt cauzate de ruptură cromozomială (având în vedere faptul că pierderea cromozomială nu ar fi detectată în testul de aberație cromozomială).

Analiză

Toate lamele, inclusiv cele cu solvent și cele cu martori netratați (dacă este cazul) și pozitivi, se codifică în mod independent înainte de examinarea la microscop a frecvenței micronucleelor. Se utilizează tehnici corespunzătoare pentru controlul oricărui rezultat denaturat sau abateri atunci când se utilizează un sistem automat de examinare, de exemplu, citometria de flux, citometria cu scanare laser sau analiza imaginii. Indiferent de platforma automată utilizată pentru exprimarea numărului de micronuclee, CBPI, RI, RICC sau RPD se evaluează concomitent.

În culturile tratate cu citoB, frecvența micronucleelor se analizează în cel puțin 2000 de celule binucleate pe concentrație și probă martor (83), împărțite în mod egal între duplicate, dacă se utilizează duplicate. În cazul culturilor unice pe doză (a se vedea punctul 28), se analizează cel puțin 2000 de celule binucleate pe cultură (83) pentru cultura unică respectivă. În cazul în care numărul de celule binucleate disponibile pentru examinare pentru fiecare concentrație este în mod considerabil mai mic de 1000 celule pe cultură (pentru culturile duplicat) sau 2000 (pentru culturi unice) și în cazul în care nu se detectează o creștere semnificativă a numărului de micronuclee, testul se repetă utilizând mai multe celule sau la concentrații mai puțin toxice, în funcție de situație. Se acordă o deosebită atenție pentru a evita examinarea celulelor binucleate cu formă neregulată sau ale căror două nuclee prezintă o diferență de mărime considerabilă. De asemenea, celulele binucleate nu trebuie confundate cu celulele multinucleate răspândite neuniform. Celulele care conțin mai mult de două nuclee principale nu se analizează pentru micronuclee deoarece frecvența de referință a micronucleelor poate fi mai mare în acest tip de celule (84). Examinarea celulelor mononucleate este acceptabilă în cazul în care s-a demonstrat că substanța chimică de testat

▼M7

interferează cu activitatea citoB. Repetarea testului fără citoB poate fi utilă în astfel de cazuri. Examinarea celulelor mononucleate în plus față de celulele binucleate (85) (86) poate oferi informații utile, dar nu este obligatorie.

Pentru liniile celulare testate fără tratament citoB, micronucleele se analizează pentru cel puțin 2000 de celule pentru fiecare concentrație de testare și probă martor (83), împărțite în mod egal între duplicate, dacă se utilizează duplicate. Atunci când se utilizează culturi unice pentru fiecare concentrație (a se vedea punctul 28), se examinează cel puțin 2000 de celule pe cultură pentru cultură unică respectivă. În cazul în care numărul de celule disponibile pentru examinare pentru fiecare concentrație este în mod considerabil mai mic de 1000 celule pe cultură (pentru culturile duplicat) sau 2000 (pentru culturi unice) și în cazul în care nu se detectează o creștere semnificativă a numărului de micronuclee, testul se repetă utilizând mai multe celule sau la concentrații mai puțin toxice, în funcție de situație.

Atunci când se utilizează citoB, se determină CBPI sau RI pentru a evalua proliferarea celulară (a se vedea apendicele 2) utilizând cel puțin 500 de celule pe cultură. Atunci când tratamentele se efectuează în absența citoB, este esențial să se demonstreze că celulele în culturi s-au divizat, astfel cum a fost discutat la punctele 24-28.

Competența de laborator

Pentru a stabili o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acesteia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul trebuie să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe chimice de referință pozitive acționând prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică și una acționând prin intermediul unui mecanism aneugenic și selecționate dintre substanțele chimice enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (inclusiv culturi netratate și diferiți solvenți/vehicul). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi trebuie să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Acest lucru nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioară disponibilă, astfel cum este definit la punctele 49-52.

O serie de substanțe chimice martor pozitive (a se vedea tabelul 1) se analizează cu tratamente de scurtă și de lungă durată în absența activării metabolice, precum și, de asemenea, cu tratament de scurtă durată în prezența activării metabolice, pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțe chimice clastogene și aneugene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al procedurilor de examinare (analiză vizuală microscopică, citometria de flux, citometria cu scanare laser sau analiza imaginii). O plajă de valori de concentrații ale substanțelor chimice selectate se alege astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date privind martorii testați anterior

Laboratorul trebuie să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori negativi, în cazul în care acestea există. Pe măsură ce tot mai multe date experimentale se adaugă la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la 95 % din limitele de control ale respectivei distribuții (87) (88). Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului trebuie să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat ca aceasta să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C și X-bar (88)] pentru a identifica gradul de

▼M7

variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (83). Referințele bibliografice prezintă recomandări suplimentare privind modalitatea în care se pot constitui și utiliza datele anterioare (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor în datele istorice și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (87).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența datelor cu bazele de date cu privire la martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

Datele privind martorii negativi trebuie să fie constituite din incidența celulelor micronucleate dintr-o cultură unică sau suma dintre culturile replicate, astfel cum este descris la punctul 28. Martorii negativi testați în paralel trebuie să fie, în mod ideal, de până la limitele de control de 95 % ale distribuției bazelor de date privind martorii negativi testați anterior ale laboratorului (87) (88). În cazul în care datele privind martorii negativi testați în paralel se situează în afara limitelor de control de 95 %, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme și există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 50) și nu există nicio dovadă de defecțiuni tehnice sau umane.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

În cazul în care se utilizează tehnica blocării citocinezei, doar frecvențele celulelor binucleate prezentând micronuclee (independent de numărul de micronuclee dintr-o celulă) se utilizează pentru evaluarea inducției de micronuclee. Examinarea numărului celulelor prezentând unul, două sau mai multe micronuclee poate fi raportată separat și ar putea oferi informații utile, dar nu este obligatorie.

Se efectuează măsurători paralele de citotoxicitate și/sau citostază pentru toate tipurile de culturi tratate, martor negative și pozitive (16). De asemenea, se calculează CBPI sau RI pentru toate culturile tratate și cele martor ca măsurători de întârziere a ciclului celular atunci când se utilizează metoda blocării citocinezei. În absența citoB, se utilizează RPD sau RICC (a se vedea apendicele 2).

Datele se indică individual pentru fiecare cultură. În plus, toate datele se sintetizează sub formă de tabel.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

— Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 50.

— Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 50) trebuie să determine reacții care sunt compatibile cu baza de date cu privire la martorii testați anterior a laboratorului și trebuie să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

— Criteriile de proliferare celulară în martorul solvent trebuie să fie îndeplinite (punctele 25-27).

— Toate condițiile experimentale au fost testate, cu excepția cazului în care una a condus la rezultate pozitive (punctele 36-40).

— Un număr adecvat de celule și concentrații sunt analizabile (punctele 28 și 44-46).

▼M7

— Criteriile de selecție a concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 24-31.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctele 36-39):

— cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel (89)

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză în cel puțin o condiție experimentală (a se vedea punctul 28)

— oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date privind martori negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 52).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, substanța chimică de testat este considerată, prin urmare, capabilă de a induce rupturi cromozomiale și/sau câștig sau pierdere în cadrul respectivului sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (90) (91) (92).

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctele 36-39):

— niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

— toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limite de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 52).

Substanța chimică testată este considerată, prin urmare, incapabilă de a induce rupturi cromozomiale și/sau câștig sau pierdere în cadrul respectivului sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă, de asemenea, recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (90) (91) (92).

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv astfel cum este descris mai sus și/sau pentru a asista la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele se evaluează de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Examinarea de celule suplimentare (dacă este cazul) sau repetarea experimentului folosind posibile condiții experimentale modificate [de exemplu, intervale dintre concentrații, alte condiții de activare metabolică [și anume, concentrație S9 sau origine S9)] ar putea fi utile.

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date nu va permite o concluzie pozitivă sau negativă și, prin urmare, aceasta va fi stabilită drept echivocă.

Substanțele chimice de testat care induc micronuclee în testul MNvit pot efectua acest lucru deoarece induc ruptură cromozomială, pierdere cromozomială sau o combinație a acestor două. Analize suplimentare utilizând anticorpi antikinetocori, sonde centrometrice *in situ* sau alte metode pot fi utilizate pentru a determina dacă mecanismul inducției de micronuclee se datorează activității clastogene și/sau aneugene.

▼M7

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— reactivitatea substanței chimice de testat cu solventul/vehiculul sau mediul de cultură celulară;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului;

— procentul de solvent în mediul final de cultură

Celule:

— tipul și sursa celulelor utilizate;

— caracterul adecvat al tipului de celulă utilizat;

— absența micoplasmei, în cazul liniilor celulare;

— pentru liniile celulare, informații privind durata ciclului celular sau indicele de proliferare;

— în cazul în care se utilizează limfocite, sexul donatorilor de sânge, vârstă și orice informație relevantă cu privire la donator, sângele integral sau limfocite separate, mitogenul utilizat;

— durata normală a unui ciclu celular (martor negativ);

— numărul de pasaje, dacă este disponibil, pentru liniile celulare;

— metodele de întreținere a culturilor celulare, pentru liniile celulare;

— numărul modal de cromozomi, pentru liniile celulare.

▼M7

Condiții de testare:

— identitatea substanței de blocare a citocinezei (de exemplu, citoB), dacă se utilizează, concentrația acesteia și durata de expunere a celulelor;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată ca o concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— justificarea selecției concentrațiilor și a numărului de culturi, inclusiv date privind citotoxicitatea și limitele de solubilitate;

— compoziția mediului, concentrația de CO_2, dacă este cazul, gradul de umiditate;

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura și timpul de incubație;

— durata tratamentului;

— perioada de recoltă după tratament;

— densitatea celulară la momentul însămânțării, dacă se aplică;

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursă S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația sau volumul amestecului S9 și S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale S9 (de exemplu, activitate enzimatică, sterilitate, capacitatea metabolică);

— substanțele martor pozitive și negative, concentrații finale, condițiile și durata tratamentului și perioadele de recuperare;

— metodele de preparare a lamelor și tehnica de colorare utilizată;

— criteriile pentru examinarea celulelor micronucleate (selecția celulelor analizabile și identificarea micronucleului);

— numărul de celule analizate;

— metode de măsurare a citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— criteriile în funcție de care un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metoda (metodele) de analiză statistică utilizată (utilizate);

— metode, precum utilizarea de anticorpi kinetocori sau sonde pancentromerice, pentru a determina dacă micronucleele conțin cromozomi întregi sau cromozomi fragmentați, dacă se aplică;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea și precipitarea.

Rezultate:

— definiția celulelor acceptabile pentru analiză;

— în absența cytoB, numărul celulelor tratate și numărul de celule recoltate pentru fiecare cultură în cazul liniilor celulare;

▼M7

— metoda de măsurare a citotoxicității utilizată, de exemplu, CBPI sau RI în cazul metodei de blocare a citocinezei; RICC sau RPD atunci când nu se utilizează metode de blocare a citocinezei; alte observații, dacă este cazul (de exemplu, gradul de confluență celulară, apoptază, necroză, numărarea celulelor în metafază, frecvența celulelor binucleate);

— semne de precipitare și ora determinării;

— date privind pH-ul și osmolalitatea mediului de tratament, dacă acestea au fost determinate;

— distribuția celulelor mono-, bi- și multinucleate, dacă se utilizează o metodă de blocare a citocinezei;

— numărul de celule cu micronuclee, furnizat separat pentru fiecare cultură tratată și cultură martor, precizându-se dacă acestea provin din celule binucleate sau mononucleate, după caz;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— date cu privire la substanțele martor negative (solvent/vehicul) și pozitive testate anterior, cu intervale, valori medii și deviații standard și limite de control de 95 % pentru distribuție, precum și numărul datelor;

— analiză statistică; valorile P, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD(2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, p. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, p. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, p. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, p. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, p. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, p. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, p. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, p. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, p. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, p. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, p. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, p. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, p. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, p. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, p. 153-163.

(18) Capitolul B.10 din prezenta anexă: *Test in vitro de aberație cromozomială pe celule de mamifere,*.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, p. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, p. 45-59.

▼**M7**

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, p. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, p. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, p. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000).*In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, p. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, p. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, p. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, p. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, p. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, p. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, p. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, p. 105-115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, disponibil la: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponibil la: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, p. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing.*Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, p. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, p. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, p. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, p. 177183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, p. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, p. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, p. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, p. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, p. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, p. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay.*Mutagenesis*, Vol. 27/3, p. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, p. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, p. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/12, p. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. **37/1**, p. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, p. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, p. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, p. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, p. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, p. 51-59.

(61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibil la: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, p. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", în Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, p. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, p. 795801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, p. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, p. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, p. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, p. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, p. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, p. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011).*In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 101-107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponibil la cerere.

▼**M7**

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, p. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, p. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, p. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, p. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, p. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, p. 280-286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, p. 355-362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, p. 33-40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, p. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, p. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, p. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology andEnvironmental Mutagenesis*, Vol.723/2, p. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test", in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. paik (2003). Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, p. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, p. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼**M7**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneugen: orice substanță chimică sau proces care, prin interacțiunea cu componentele aparatului ciclului celular de diviziune mitotică și meiotică, conduce la apariția aneuploidiei în celule sau organisme.

Aneuploidie: orice deviere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi, cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Apoptoză: moarte celulară programată caracterizată printr-o succesiune de etape conducând la dezintegrarea celulelor în particule membranare care sunt apoi eliminate prin fagocitoză sau excreție.

Proliferare celulară: creșterea numărului de celule ca rezultat al diviziunii celulare mitotice.

Centromer: regiunea ADN-ului unui cromozom unde cele două cromatide sunt legate între ele și pe care cei doi kinetocori sunt fixați unul lângă altul.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Concentrații: se referă la concentrațiile finale ale substanței chimice de testat în mediul de cultură.

Clastogen: Orice substanță chimică sau eveniment care cauzează aberații cromozomiale structurale în populații de celule sau organisme eucariote.

Citocineză: procesul de diviziune celulară care survine imediat după mitoză pentru a forma două celule fiice, fiecare conținând un nucleu unic.

Indice de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI): proporția de celule provenite de la a doua diviziune în populația tratată în raport cu populația martor netratată (a se vedea formulele din apendicele 2).

Citostază: inhibarea creșterii celulare (a se vedea formulele din apendicele 2).

Citotoxicitate: Pentru testele reglementate în prezenta metodă de testare, efectuate în prezența citocalasinei B, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a indicelui de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI) sau a indicelui de replicație (RI) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 26 și apendicele 2).

Pentru testele reglementate în prezenta metodă de testare, efectuate în absența citocalasinei B, citotoxicitatea este identificată ca fiind o reducere a dublării relative a populației (RPD) sau a creșterii relative a numărului de celule (RICC) a celulelor tratate în comparație cu martorul negativ (a se vedea punctul 27 și apendicele 2).

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv rupturi, deleții, aducții, modificări și legături nucleotidice, rearanjări, mutații ale genelor, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Celule în interfază: celule care nu se află în etapa de mitoză.

Kinetocor: structură proteică situată la nivelul centromerului unui cromozom la care se asociază fibrele fusoriale în timpul diviziunii celulare, permițând mișcarea ordonată a cromozomilor fiice către polii celulelor fiice.

▼M7

Micronuclee: nuclee mici, separate de nucleele principale ale celulelor și prezente în plus față de acestea, produse în timpul telofazei mitozei sau meiozei de către fragmentele de cromozomi sau de cromozomii întregi întârziați.

Mitoză: divizarea nucleului celular, împărțită în general în profază, prometafază, metafază, anafază și telofază.

Indice mitotic (MI): numărul celulelor în metafază împărțit la numărul total de celule observate într-o populație de celule; un indicator al gradului de proliferare celulară a populației respective.

Mutagen: agent care produce o modificare ereditară uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN genic sau structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Nondisjuncție: lipsa separării unei perechi de cromatide, care nu reușesc să migreze în mod corespunzător către celulele fiice formate, fapt care determină prezența unui număr anormal de cromozomi în celulele fiice.

Status p53: proteina p53 este implicată în reglementarea circuitului de celule, apoptoză și regenerare a ADN-ului. Celulele cu deficit de proteină funcțională p53 care se află în imposibilitatea de a inhiba ciclul celular sau de a elimina celulele deteriorate prin intermediul apoptozei sau al altor mecanisme (de exemplu, inducția de regenerare a ADN-ului) relaționate cu funcțiile p53 care funcționează ca răspuns la deteriorarea ADN-ului sunt, în mod teoretic, mai predispuse la mutații ale genelor sau aberații cromozomiale.

Poliploidie: aberații cromozomiale numerice în celule sau organisme implicând unul sau mai multe seturi întregi de cromozomi, spre deosebire de unul sau mai mulți cromozomi izolați (aneuploidie).

Indice de proliferare: metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Creștere relativă a numărului de celule (RICC): metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Dublare relativă a populației (RPD): metodă de măsurare a citotoxicității atunci când nu se utilizează citoB (a se vedea formulele din apendicele 2).

Indice de replicație (RI): proporția ciclurilor de diviziune celulară complete într-o cultură tratată în raport cu cultura martor netratată, în timpul perioadei de expunere și de recuperare (a se vedea formulele din apendicele 2).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amenstec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Martor solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc solventul singur utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

Martor netratat: culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici substanță chimică de testat, nici solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan în același mod precum culturile care primesc substanța chimică de testat.

▼M7

Apendicele 2

FORMULE PENTRU EVALUAREA CITOTOXICITĂȚII

În cazul utilizării citoB, evaluarea citotoxicității se bazează **pe indicele de proliferare a celulelor a căror citocineză a fost blocată (CBPI)** sau pe **indicele de replicație (RI)** (17) (69). CBPI indică numărul mediu de nuclee pe celulă și poate fi utilizat pentru a calcula proliferarea celulară. RI indică numărul relativ de cicluri celulare pe celulă efectuate în timpul perioadei de expunere la citoB în culturile tratate comparativ cu culturile martor și poate fi utilizat pentru a calcula % de citostază:

$$\% \text{ Citostază} = 100\text{-}100[(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)]$$

Și:

T = cultură tratată cu substanța chimică de testat

C = cultură martor

Unde:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Nr.de celule mononucleate}) + (2 \times \text{Nr.de celule binucleate}) + (3 \times \text{Nr.de celule multinucleate}))}{(\text{Număr total de celule})}$$

Prin urmare, un CBPI egal cu 1 (toate celulele sunt mononucleate) este echivalent cu o citostază de 100 %.

Citostază = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{Nr.de celule binucleate}) + (2 \times \text{Nr.de celule multinucleate}))/(\text{Număr total de celule})_T}{((\text{Nr.de celule binucleate}) + (2 \times \text{Nr.de celule multinucleate}))/(\text{Număr total de celule})_C} \times 100$$

T = culturi tratate

C = culturi martor

Astfel, un RI de 53 % înseamnă că, în comparație cu numărul de celule care au efectuat o diviziune celulară pentru a forma celule binucleate și multinucleate în cultura martor, doar 53 % din acest număr au efectuat o diviziune în cultura tratată, și anume o citostază de 47 %.

În absența utilizării citoB, se recomandă evaluarea citotoxicității pe baza **creșterii relative a numărului de celule (RICC)** sau a **dublării relative a populației (RPD)** (69), întrucât ambele iau în considerare proporția de populații de celule care au efectuat o diviziune celulară.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Cresterea numărului de celule în culturile tratate(la final–la început))}}{(\text{Cresterea numărului de celule în culturile martor(la final–la început))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nr.de dublări de populație în culturile tratate})}{(\text{Nr.de dublări de populație în culturile martor})} \times 100$$

unde:

Dublarea populației = [log (numărul de celule post-tratamet ÷ numărul inițial de celule)] ÷ log 2

Prin urmare, RICC sau RPD de 53 % indică o citotoxicitate/citostază de 47 %.

▼**M7**

Utilizând indicele de proliferare (PI), citotoxicitatea poate fi evaluată prin intermediul numărării clonelor compuse din 1 celulă (cl1), 2 celule (cl2), 3 până la 4 celule (cl4) și 5 până la 8 celule (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI este utilizat, de asemenea, ca un parametru fiabil și util de citotoxicitate pentru liniile celulare cultivate *in vitro* în absența citoB (35) (36) (37) (38) și poate fi considerat drept un parametru suplimentar util.

În orice caz, numărul de celule înainte de tratare trebuie să fie același pentru culturile tratate ca pentru cele martor negativ.

În timp ce RICC (și anume, numărul de celule în culturile tratate/numărul de celule în culturile martor) a fost utilizată ca parametru de citotoxicitate în trecut, aceasta nu mai este recomandată deoarece poate subestima citotoxicitatea.

În cazul în care se utilizează sisteme de examinare automate, de exemplu, citometria de flux, citometre cu scanare laser sau analiza imaginilor, numărul de celule în formula poate fi înlocuit cu numărul de nuclee.

În culturile martor negative, dublarea populației sau indicele de replicație trebuie să fie compatibil cu cerința de prelevare a celulelor după tratament, după un timp echivalent cu aproximativ 1,5-2,0 cicluri celulare normale.

▼M3

B.50. **SENSIBILIZAREA DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: DA**

INTRODUCERE

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, modificând necesitățile de reglementare și considerațiile referitoare la bunăstarea animalelor. Prima metodă de testare (MT) (B.42) pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglioni limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429), a fost revizuită (1). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). În cadrul metodei LLNA, marcajul radioizotopic cu timidină sau iod este utilizat pentru a măsura proliferarea limfocitelor și, prin urmare, testul are o aplicare limitată în regiunile unde achiziționarea, utilizarea sau eliminarea produselor radioactive pun probleme. LLNA: DA (dezvoltată de către Daicel Chemical Industries, Ltd.) este o variantă non-radioactivă a LLNA, care cuantifică conținutul de adenozină trifosfat (ATP) prin bioluminiscență ca indicator al proliferării celulare. Metoda de testare LLNA: DA a fost validată, revizuită și recomandată de către o echipă internațională de examinare care a recunoscut utilitatea acesteia în identificarea, între anumite limite, a substanțelor chimice care au sau nu un efect de sensibilizare a pielii (10) (11) (12) (13). Prezenta MT vizează evaluarea potențialului de sensibilizare dermică a substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Capitolul B.6 din prezenta anexă și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 utilizează testele pe cobai, și anume testul de maximizare la cobai și testul Buehler (14). LLNA (capitolul B.42 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea OECD nr. 429) și cele două variante non-radioactive, LLNA: DA (capitolul B.50 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 A) și LLNA: BrdU-ELISA (capitolul B.51 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 B) sunt mai avantajoase decât testele pe cobai din B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (14) în termeni de reducere și de rafinare a utilizării animalelor.

2. În mod similar cu LLNA, LLNA: DA studiază faza de inducție a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-răspuns. În plus, abilitatea de a detecta agenții de sensibilizare dermică fără a recurge la radiomarcarea ADN-ului elimină riscurile profesionale de expunere la radiații și problemele legate de gestionarea deșeurilor. În schimb, aceasta ar putea presupune o creștere a numărului de șoareci utilizați pentru detectarea agenților de sensibilizare dermică determinând, cu toate acestea, diminuarea numărului de cobai pentru testarea potențialului de sensibilizare dermică (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (14).

DEFINIȚII

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE

4. Metoda LLNA: DA este o variantă a metodei LLNA vizând identificarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice, între anumite limite. Acest lucru nu implică în mod necesar faptul că LLNA: DA trebuie să înlocuiască sistematic LLNA sau testele pe cobai (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (14), ci mai curând, că testul reprezintă un instrument de o calitate similară putând fi folosit ca alternativă și ale cărui rezultate pozitive sau negative nu mai necesită, în general, o confirmare suplimentară (10) (11). Anterior derulării studiului, laboratorul de

▼M3

testare trebuie să colecteze toate informațiile disponibile cu privire la substanța de test. Astfel de informații includ identitatea și structura chimică a substanței de test; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele tuturor celorlalte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice privind substanțele chimice asociate din punct de vedere structural. Aceste informații trebuie analizate pentru a determina dacă metoda LLNA: DA este adecvată pentru substanța de test [având în vedere incompatibilitatea anumitor tipuri de substanțe chimice cu LLNA: DA (a se vedea puncul (5)] și pentru a contribui la alegerea dozelor adecvate.

5. LLNA: DA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea sensibilizării alergice de contact. Cu toate acestea, comparativ cu testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406), aceasta are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în acest scop (14). Mai mult, LLNA: DA oferă o rafinare importantă (reducerea durerii și a suferinței) a modului în care sunt utilizate animalele pentru testarea sensibilizării alergice de contact, deoarece, spre deosebire de B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, LLNA: DA nu se bazează pe declanșarea reacțiilor de hipersensibilitate dermică prin manifestarea declanșării. În ciuda avantajelor metodei LLNA: DA comparativ cu B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (14), există anumite limite care ar putea impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 [de exemplu, testarea anumitor metale, rezultate fals pozitive cu anumite substanțe iritante pentru piele (precum anumite substanțe tensioactive) (6) (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă), solubilitatea substanței de test]. În plus, anumite substanțe sau clase de substanțe chimice conținând grupele funcționale demonstrate ca acționând ca posibili factori de confuzie (16) ar putea impune utilizarea testelor pe cobai [și anume B.6; testarea OCDE privind testarea nr. 406 (14)]. Limitele identificate pentru LLNA (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă) se recomandă ca fiind aplicabile și în cazul LLNA: DA (10). În plus, utilizarea LLNA: DA ar putea fi inadecvată în cazul testării substanțelor care modifică nivelurile ATP (de exemplu, substanțele care acționează ca inhibitori ai ATP) sau al celor care perturbă măsurarea exactă a ATP intracelular (de exemplu, prezența de enzime care degradează ATP, prezența de ATP extracelular în ganglionul limfatic). În afara acestor limite identificate, LLNA: DA se aplică oricăror substanțe de test care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea testului LLNA: DA. Mai mult, trebuie luată în considerare posibilitatea obținerii de rezultate pozitive ambigue pentru care valorile indicelui de stimulare (IS) sunt cuprinse între 1,8 și 2,5 (a se vedea punctele 31-32). Acest fapt se bazează pe baza de date de validare de 44 de substanțe prezentând un IS $\geq$ 1,8 (a se vedea punctul (6) pentru care LLNA: DA a identificat corect toți cei 32 de agenți de sensibilizare LLNA, dar a identificat incorect trei dintre cei 12 agenți de non-sensibilizare LLNA prezentând un IS cuprins între 1,8 și 2,5 (și anume rezultate pozitive de limită) (10). Cu toate acestea, deoarece același set de date a fost utilizat pentru stabilirea valorilor IS și pentru calcularea proprietăților estimative ale testului, rezultatele indicate ar putea supraestima proprietățile estimative reale.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA: DA este acela că agenții de sensibilizare induc o proliferare a limfocitelor în ganglionii limfatici care drenează porțiunea unde se aplică substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului și oferă o modalitate simplă de a obține măsurători cantitative ale sensibilizării. Proliferarea este măsurată prin compararea proliferării medii din fiecare grup de test cu proliferarea medie din grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se calculează raportul dintre proliferarea medie din fiecare grup tratat și proliferarea medie din

▼M3

grupul VC, denumit IS, iar acesta trebuie să aibă o valoare ≥ 1,8 pentru a se putea evalua în continuare substanța de test ca și potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise aici se bazează pe cuantificarea conținutului de ATP prin bioluminiscență (factor cunoscut ca fiind în corelație cu numărul de celule vii) (17) pentru a indica creșterea numărului de celule proliferate în ganglionii limfatici auriculari de drenare (18) (19). Această tehnică prin bioluminiscență utilizează enzima luciferază pentru a cataliza formarea luminii pornind de la ATP și luciferină conform reacției următoare:

$$ATP + luciferină + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxiluciferină + AMP + PP_i + CO_2 + lumină$$

Intensitatea luminii emise urmărește o traiectorie liniară în funcție de concentrația ATP și se măsoară cu ajutorul unui luminometru. Testul luciferină-luciferază constituie o metodă precisă de cuantificare a ATP și este utilizat în numeroase aplicații (20).

DESCRIEREA TESTULUI

Selectarea speciilor de animale

7. Specia selectată pentru acest test este șoarecele. Studiile de validare a LLNA: DA au fost efectuate utilizându-se exclusiv animale din rasa CBA/J, considerată, prin urmare, rasa preferată (12) (13). Se folosesc femele adulte tinere, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre acestea trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza și alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA: DA specifice rasei și/sau sexului.

Condiții de adăpostire și de hrănire

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (21), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C (± 3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

Pregătirea animalelor

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

Pregătirea dozelor

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora pe urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării pe urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

▼M3

Verificarea fiabilității

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând în mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. O serie de autorități de reglementare solicită, de asemenea, existența unei PC pentru fiecare studiu, utilizatorii sunt astfel încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA: DA. Prin urmare, utilizarea sistematică a unei PC concomitente este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt ce este câteodată impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea punctul 12). PC trebuie să reacționeze pozitiv la LLNA: DA la un nivel de expunere estimat să determine o creștere a IS ≥ 1,8 față de grupul martor negativ (NC). Doza de PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (de exemplu, un IS > 10 ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS 101-86-0) și eugenol 25 % (nr. CAS 97-53-0,) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, pot fi utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.

12. În timp ce includerea unui grup PC concomitent este recomandată, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale ≤ 6 luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA: DA în mod regulat (efectuează LLNA: DA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA: DA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecvente în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).

13. Un grup PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA: DA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau a reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în ceea ce privește determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.

14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile rezultatelor trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (22).

▼M3

15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară, de asemenea, testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (23). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclusă un VC separat pentru PC concomitent.

16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

— similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;

— caracteristici fizico-chimice cunoscute;

— date justificative obținute cu ajutorul LLNA: DA;

— date justificative obținute cu ajutorul altor modele animale și/sau de la om.

PROCEDURA DE TESTARE

Număr de animale și doze

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.

18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor oferite în referințele (2) și (24). Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test de interes (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (24) (25). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă pre-screening de testare (a se vedea punctele 21-24).

19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii concentrației maxime posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona: ulei de măsline (4:1, v/v), N,N-dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (6), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.

▼M3

20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-indivizi și o comparare statistică a măsurătorilor privind substanța de test și a celor privind grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea puncul 33). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul PC este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (22). Mai mult, o serie de autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Colectarea regulată de date specifice fiecărui animal contribuie la bunăstarea animalelor prin evitarea testelor duplicat care ar fi necesare dacă rezultatele obținute în alt mod (de exemplu, cu date colective pentru grupuri de animale) ar trebui ulterior înaintate unor autorități de reglementare care prevăd alte cerințe (de exemplu, furnizarea de date individuale).

Testarea preliminară

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA: DA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA: DA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.

22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA: DA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă una sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 8). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor și se punctează folosind tabelul 1 (25). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze), ziua 7 (24 de ore înainte de încheiere) și ziua 8. În plus, în ziua 8, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de ≥ 3 și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (26) (27). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA: DA este doza imediat inferioară din seria de concentrații pre-screening (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

Punctaje acordate eritemelor

Observație	Punctaj
Fără eritem	0
Eritem foarte ușor (abia perceptibil)	1
Eritem bine definit	2

▼M3

Observație	Punctaj
Eritem moderat spre grav	3
Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului	4

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (26) (27), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu șoarecii martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Cu toate acestea, deși pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (30) (31) (32) (33) (34).

24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (35) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA: DA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și orice semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutății corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 8, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (36).

Schema de tratament a studiului principal

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

— *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică o soluție apoasă de lauril sulfat de sodiu (SLS) 1 % în regiunea dorsală a fiecărei urechi cu ajutorul unei pensule muiate în soluția SLS, astfel încât să se acopere întreaga suprafață dorsală a fiecărei urechi cu patru până la cinci aplicări. După o oră de la aplicarea tratamentului cu SLS, se aplică 25 μL de substanță de test diluată în mod adecvat, doar din vehicul sau din PC (concomitent sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.

— *Zilele 2, 3 și 7:* Se repetă tratamentul prealabil cu soluție apoasă de SLS 1 % apoi se aplică substanța de test urmând aceeași procedură ca în ziua 1.

— *Zilele 4, 5 și 6:* Nu se aplică tratament.

— *Ziua 8:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal și toate observațiile clinice. După aproximativ 24-30 de ore de la începutul aplicării (în ziua 7), animalele se eutanasiază. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în soluție tamponată cu fosfat (PBS) pentru fiecare animal. Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi găsite în referință (22). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutății eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).

▼M3

Prepararea suspensiilor celulare

26. Pentru fiecare șoarece, se prepară o suspensie de celule izolate provenind din ganglionii limfatici (LNC) excizați bilateral, prin plasarea ganglionilor între două lamele din sticlă pe care se exersează o presiune ușoară pentru a strivi eșantioanele. După ce s-a verificat faptul că țesutul s-a răspândit adecvat, se separă cele două lamele. Se suspendă țesutul de pe ambele lamele în PBS, înclinând fiecare lamelă deasupra cutiei Petri apoi se clătește cu PBS răzuind concomitent țesutul de pe lamelă cu o raşchetă pentru celule. Ganglionii limfatici de la animalele din NC fiind mici, este important ca aceştia să fie tratați cu grijă pentru a se evita orice efecte artificiale induse valorilor IS. Volumul total de PBS utilizat pentru clătirea celor două lamele este de 1 mL. Se omogenizează uşor suspensia de LNC în cutia Petri cu ajutorul raşchetei pentru celule. Se prelevează apoi o alicotă de 20 μL de suspensie LNC cu o micropipetă, având grijă să nu se desprindă membrana vizibilă cu ochiul liber, apoi aceasta se amestecă cu 1,98 mL de PBS pentru a se obține un eșantion de 2 mL. Un al doilea eșantion de 2 mL se prepară respectând aceeași procedură, astfel încât să fie preparate 2 eșantioane pentru fiecare animal.

Determinarea proliferării celulare (măsurarea conținutului de ATP din limfocite)

27. Creșterile de conținut ATP din ganglionii limfatici se măsoară prin metoda luciferină/luciferază cu un set de măsurare a ATP care măsoară bioluminiscența, exprimată în unități relative de luminiscență (RLU). Timpul dintre eutanasierea animalelor și cuantificarea conținutului de ATP pentru fiecare individ trebuie să fie menținut constant și să nu depășească aproximativ 30 de minute deoarece se consideră că ATP se diminuează treptat de la momentul eutanasierii (12). Astfel, seria de proceduri de la excizarea nodulilor limfatici auriculari până la măsurarea conținutului de ATP trebuie să fie realizată în 20 de minute, conform unui program pre-stabilit valabil pentru toate animalele. Luminiscența datorată conținutului de ATP trebuie măsurată în toate eșantioanele de 2 mL, și anume un total de două măsurători ale ATP pentru fiecare animal. Se determină apoi media rezultatelor, iar aceasta este utilizată în calculele următoare (a se vedea puncul 30).

OBSERVAȚII

Observații clinice

28. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricăror semne clinice, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau coroziunea pielii în vederea eutanasierii (36).

Greutatea corporală

29. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

CALCULAREA REZULTATELOR

30. Rezultatele pentru fiecare grup tratat se exprimă printr-un indice de stimulare (IS) mediu. IS se calculează împărțind media RLU/șoarece în fiecare grup tratat cu substanța de test și grupul PC la media RLU/șoarece în grupul martor tratat cu solvent/vehicul (VC). IS mediu pentru VC este, prin urmare, egal cu 1.

▼M3

31. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când IS ≥ 1,8 (10). Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită (și anume, cu valori ale IS cuprinse între 1,8 și 2,5) ca fiind pozitiv (2) (3) (37).

32. În cazul unui răspuns pozitiv ambiguu cu valori ale IS cuprinse între 1,8 și 2,5, experimentatorii pot examina informații adiționale precum relația doză-răspuns, manifestările de toxicitate sistemică sau iritație excesivă și, dacă este cazul, semnificația statistică împreună cu valorile IS pentru a confirma că astfel de rezultate sunt pozitive (10). Diferitele proprietăți ale substanței de test trebuie, de asemenea, luate în considerare, inclusiv o eventuală analogie structurală cu agenți de sensibilizare dermică cunoscuți, declanșarea unei iritații dermice excesive la șoarece și natura relației doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt examinate în detaliu într-un alt document (4).

33. Colectarea de date pentru fiecare șoarece permite o analiză statistică a existenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparări ale grupurilor testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparări pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul variațelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite uneori „valori aberante”).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

34. Datele se sistematizează sub formă de tabele indicând valorile RLU pentru fiecare animal, media RLU/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) și indicele de stimulare mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul.

Raportul de testare

35. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de test și cele martor:

— date de identificare (de exemplu, numărul CAS și numărul CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);

— starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);

— în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

— date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);

— justificarea alegerii vehiculului;

▼**M3**

Animalele de experiență:

— proveniența șoarecilor CBA;

— statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

— sursa, numărul lotului, datele furnizate de producător cu privire la asigurarea calității/controlului de calitate pentru setul ATP;

— detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;

— justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);

— concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);

— detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;

— metodele de măsurare a toxicității;

— criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;

— detalii privind oricare abateri de la protocol și explicații referitoare la modul în care abaterea afectează conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

— un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;

— rezultatele martorilor specifici laboratorului de testare pentru pozitiv concomitent și/sau istoric, precum și pentru martorul negativ concomitent;

— în cazul în care nu a fost inclus un grup PC concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent grup PC periodic și un raport detaliind datele istorice privind PC specifice laboratorului, astfel încât să se justifice de ce nu a fost realizat un grup PC concomitent;

Rezultate:

— greutatea fiecărui animal la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;

— momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;

— ora eutanasierii animalului și ora măsurării conținutului de ATP pentru fiecare animal;

— un tabel cu valorile RLU și IS pe șoarece pentru fiecare grup tratat;

— media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a RLU/șoarece pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante în cadrul fiecărui grup;

▼M3

— indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în grupurile tratate cu substanța de test, cât și în grupurile martor;

— relația doză-răspuns;

— analize statistice, dacă este cazul;

Discutarea rezultatelor:

— un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, și o concluzie care să indice dacă substanța de test trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (38).

Substanță etalon: O substanță de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparația cu o substanță de test. O substanță etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigure; (ii) asemănări structurale și funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; și (v) influență cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Fals negativ: O substanță de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, aceasta fiind de fapt pozitivă sau activă.

Fals pozitiv: O substanță de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, aceasta fiind de fapt negativă sau inactivă.

Pericol: Potențialul de efect negativ asupra mediului sau sănătății. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

Reproductibilitatea inter-laborator: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproductibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de validare prealabilă și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes inter-laborator, denumită, de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (38).

Reproductibilitatea intra-laborator: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (38).

Valoare aberantă: O valoare aberantă este o observație considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eșantion aleatoriu dintr-o populație.

Asigurarea calității: Un proces de gestionare prin care aderarea la standardele și cerințele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor și acuratețea transferului de date sunt evaluate de către persoane independente de cele care au efectuat testarea.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, folosind același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (38).

Sensibilizare dermică: Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun ce poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

Indice de stimulare (IS): O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test, și anume raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate și cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

Substanța de test (denumită, de asemenea, substanță chimică de test): Orice substanță sau amestec testat prin intermediul prezentei metode de testare.

▼M3

B.51. **SENSIBILIZARE DERMICĂ: TESTUL LOCAL PE GANGLIONI LIMFATICI: BrdU-ELISA**

INTRODUCERE

1. Orientările OCDE privind testarea substanțelor chimice și metodele de testare UE bazate pe acestea sunt periodic revizuite în lumina progresului științific, modificând necesitățile de reglementare și considerațiile referitoare la bunăstarea animalelor. Prima metodă de testare (MT) (B.42) pentru determinarea sensibilizării dermice la șoarece, testul local pe ganglioni limfatici (LLNA; orientarea OCDE privind testarea nr. 429), a fost revizuită (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă). Detaliile privind validarea LLNA, precum și o revizuire a lucrărilor asociate au fost publicate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). În cadrul metodei LLNA, marcajul radioizotopic cu timidină sau iod este utilizat pentru a măsura proliferarea limfocitelor, prin urmare, testul are o aplicare limitată în regiunile unde achiziționarea, utilizarea sau eliminarea produselor radioactive pun probleme. LLNA: BrdU-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – testul de imunoabsorbție prin enzimă legată) este o variantă non-radioactivă a MT LLNA, care utilizează 5-bromo-2-dezoxiuridina (BrdU) (nr. CAS 59-14-3) non-radiomarcată într-un test de tip ELISA pentru a măsura proliferarea limfocitelor. Metoda de testare LLNA: BrdU-ELISA a fost validată, revizuită și recomandată de către o echipă internațională de examinare care a recunoscut utilitatea acesteia în identificarea, între anumite limite, a substanțelor chimice care au sau nu un efect de sensibilizare a pielii (10) (11) (12). Prezenta MT vizează evaluarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) la animale. Capitolul B.6 din prezenta anexă și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 utilizează testele pe cobai, și anume testul de maximizare la cobai și testul Buehler (14). LLNA (capitolul B.42 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea OECD nr. 429) și cele două variante non-radioactive, LLNA: BrdU-ELISA (capitolul B.51 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 B) și LLNA: DA (capitolul B.50 din prezenta anexă; orientarea OCDE privind testarea nr. 442 A), sunt mai avantajoase decât testele pe cobai din B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13) în termeni de reducere și de rafinare a utilizării animalelor.

2. În mod similar cu LLNA, metoda LLNA: BrdU-ELISA studiază faza de inducție a sensibilizării dermice și furnizează date cantitative adecvate pentru evaluarea relației doză-răspuns. În plus, abilitatea de a detecta agenții de sensibilizare dermică fără a recurge la radiomarcarea ADN-ului elimină riscurile profesionale de expunere la radiații și problemele legate de gestionarea deșeurilor. În schimb, aceasta ar putea presupune o creștere a numărului de șoareci utilizați pentru detectarea agenților de sensibilizare dermică determinând, cu toate acestea, diminuarea numărului de cobai pentru testarea potențialului de sensibilizare dermică (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13).

DEFINIȚII

3. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE

4. Metoda LLNA: BrdU-ELISA este o variantă a metodei LLNA vizând identificarea potențialului de sensibilizare dermică al substanțelor chimice, între anumite limite. Aceasta nu implică în mod necesar faptul că LLNA: BrdU-ELISA trebuie să înlocuiască sistematic LLNA sau testele pe cobai (și anume, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406) (13), ci, mai curând, că testul reprezintă un instrument de o calitate similară care poate fi utilizat ca alternativă și ale cărui rezultate pozitive sau negative nu mai necesită, în general, o confirmare suplimentară (10) (11). Anterior derulării studiului, laboratorul de testare trebuie să colecteze toate informațiile disponibile cu privire la substanța de test. Astfel de informații includ

▼M3

identitatea și structura chimică a substanței de test; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatelor tuturor celorlalte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* pentru substanța de test și datele toxicologice privind substanțele chimice asociate din punct de vedere structural. Aceste informații trebuie analizate pentru a determina dacă metoda LLNA: BrdU-ELISA este adecvată pentru substanța de test [având în vedere incompatibilitatea anumitor tipuri de substanțe chimice cu LLNA: BrdU-ELISA (a se vedea puncul 5) și pentru a contribui la alegerea dozelor adecvate.

5. Metoda LLNA: BrdU-ELISA este o metodă *in vivo* și, prin urmare, nu elimină utilizarea animalelor pentru evaluarea sensibilizării alergice de contact. Cu toate acestea, comparativ cu testele pe cobai (B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406), aceasta are potențialul de a reduce numărul de animale utilizate în acest scop (13). Mai mult, LLNA: BrdU-ELISA oferă o rafinare importantă a modului în care sunt utilizate animalele pentru testarea sensibilizării alergice de contact, deoarece, spre deosebire de B.6 și orientarea OCDE privind testarea nr. 406, LLNA: BrdU-ELISA nu se bazează pe declanșarea reacțiilor de hipersensibilitate dermică prin manifestarea declanșării. În plus, LLNA: BrdU-ELISA nu necesită utilizarea unui adjuvant ca în cazul testului de maximizare pe cobai (capitolul B.6 din prezenta anexă, 13). Astfel, LLNA: BrdU-ELISA reduce suferința animalelor. În ciuda avantajelor LLNA: BrdU-ELISA comparativ cu B.6 și cu orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13), există anumite limite care ar putea impune utilizarea metodei B.6 sau a orientării OCDE privind testarea nr. 406 [de exemplu, testarea anumitor metale, rezultate fals pozitive cu anumite substanțe iritante pentru piele (precum anumite substanțe tensioactive) (6) (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă), solubilitatea substanței de test]. În plus, anumite substanțe sau clase de substanțe chimice conținând grupele funcționale demonstrate ca reprezentând posibili factori de confuzie (15) ar putea impune utilizarea testelor pe cobai [de exemplu, B.6; orientarea OCDE privind testarea nr. 406 (13)]. Limitele identificate pentru LLNA (1 și capitolul B.42 din prezenta anexă) se recomandă ca fiind aplicabile și în cazul LLNA: BrdU-ELISA (10). În afara acestor limite identificate, LLNA: BrdU-ELISA se aplică oricăror substanțe de test care nu prezintă proprietăți susceptibile să afecteze acuratețea testului LLNA: BrdU-ELISA. Mai mult, trebuie luată în considerare posibilitatea obținerii de rezultate pozitive limită pentru care valorile indicelui de stimulare (IS) sunt cuprinse între 1,6 și 1,9 (a se vedea punctele 31-32). Acest fapt se bazează pe baza de date de validare alcătuită din 43 de substanțe prezentând un IS $\geq$ 1,6 (a se vedea puncul 6) pentru care LLNA: BrdU-ELISA a identificat corect toți cei 32 de agenți de sensibilizare LLNA, dar a identificat incorect doi dintre cei 11 agenți de non-sensibilizare LLNA prezentând un IS cu valori cuprinse între 1,6 și 1,9 (și anume rezultate pozitive de limită) (10). Cu toate acestea, deoarece același set de date a fost utilizat pentru stabilirea valorilor IS și pentru calcularea proprietăților estimative ale testului, rezultatele indicate ar putea supraestima proprietățile estimative reale.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

6. Principiul fundamental care stă la baza LLNA: BrdU-ELISA este acela că agenții de sensibilizare induc o proliferare a limfocitelor în ganglionii limfatici care drenează porțiunea unde se aplică substanța de test. Proliferarea este proporțională cu doza aplicată și cu puterea alergenului și oferă o modalitate simplă de a obține măsurători cantitative ale sensibilizării. Proliferarea este măsurată prin compararea proliferării medii din fiecare grup de test cu proliferarea medie din grupul martor tratat cu vehicul (VC). Se calculează raportul dintre proliferarea medie din fiecare grup tratat și proliferarea medie din grupul VC, denumit IS, care trebuie să aibă o valoare $\geq$ 1,6 pentru a se putea evalua în continuare substanța de

▼M3

test ca potențial agent de sensibilizare dermică. Procedurile descrise aici se bazează pe măsurarea conținutului de BrdU pentru a indica creșterea numărului de celule în proces de proliferare în ganglionii limfatici auriculari de drenare. BrdU este un analog al timidinei care se încorporează în același mod în ADN-ul celulelor în proces de proliferare. Încorporarea BrdU se măsoară cu ELISA, care utilizează un anticorp specific pentru BrdU marcat, de asemenea, cu peroxidază. Peroxidaza reacționează apoi cu un substrat adăugat special pentru a produce un compus colorat dozat cu un sistem de redare a plăcilor de microtitrare la o absorbanță specifică.

DESCRIEREA TESTULUI

Selectarea speciilor de animale

7. Specia selectată pentru acest test este șoarecele. Studiile de validare a LLNA: BrdU-ELISA au fost efectuate utilizându-se exclusiv animale din rasa CBA/JN, considerată, prin urmare, rasa preferată (10) (12). Se folosesc femele adulte tinere, nulipare și care nu sunt însărcinate. La începutul studiului, animalele trebuie să aibă între 8-12 săptămâni, iar diferențele de greutate dintre acestea trebuie să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie. Se pot utiliza și alte rase și masculi dacă se generează suficiente date pentru a demonstra că nu există diferențe semnificative în răspunsul la LLNA: BrdU-ELISA specifice rasei și/sau sexului.

Condiții de adăpostire și de hrănire

8. Șoarecii trebuie adăpostiți în grupuri (16), cu excepția cazului în care sunt furnizate justificări științifice adecvate pentru adăpostirea acestora în incinte individuale. Temperatura sălii în care se află animalele de experiență trebuie să fie de 22 °C ± 3 °C. Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și este preferabil să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este ca aceasta să fie de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă.

Pregătirea animalelor

9. Animalele se selectează aleatoriu, se marchează pentru a putea fi identificate individual (dar nu se folosește niciun tip de crotalie) și se țin în cuști timp de cel puțin 5 zile înainte de a se începe administrarea dozei astfel încât să se aclimatizeze la condițiile de laborator. Toate animalele sunt examinate înainte de începerea tratamentului, pentru a se stabili că nu prezintă leziuni observabile la nivel dermic.

Pregătirea dozelor

10. Substanțele chimice solide trebuie dizolvate sau suspendate în solvenți/vehicule și diluate, dacă este cazul, anterior aplicării acestora pe urechea șoarecilor. Substanțele chimice lichide pot fi aplicate pure sau diluate anterior dozării. Substanțele chimice insolubile precum cele observate în general la dispozitivele medicale ar trebui să fie supuse unui proces de extracție amplificată într-un solvent adecvat pentru a indica toți constituenții care pot fi extrași pentru testare anterior aplicării pe urechea șoarecilor. Substanțele de test ar trebui preparate zilnic, cu excepția cazului în care datele privind stabilitatea demonstrează faptul că acestea pot fi stocate.

Verificarea fiabilității

11. Substanțele martor pozitive (PC) contribuie la demonstrarea performanței adecvate a testului răspunzând în mod adecvat și reproductibil la o substanță de sensibilizare de test pentru care magnitudinea răspunsului este bine cunoscută. Este recomandată includerea unei PC concomitente deoarece aceasta demonstrează competența laboratorului de a realiza corect fiecare test și permite evaluarea comparabilității și reproductibilității intra-laborator și inter-laborator. Anumite autorități solicită, de asemenea,

▼M3

existența unei PC pentru fiecare studiu; prin urmare, utilizatorii sunt încurajați să consulte autoritățile relevante înainte de realizarea testului LLNA: BrdU-ELISA. Prin urmare, utilizarea sistematică a unei PC concomitente este încurajată pentru a evita necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe animale, fapt care este câteodată impus prin utilizarea unei PC testate periodic (a se vedea puncul 12). PC trebuie să reacționeze pozitiv la LLNA: BrdU-ELISA la un nivel de expunere estimat să determine o creștere a IS ≥ 1,6 față de grupul martor negativ (NC). Doza de PC trebuie aleasă astfel încât să nu cauzeze iritare dermică excesivă sau toxicitate sistemică, iar inducerea răspunsului să fie reproductibilă, dar nu excesivă (de exemplu, un SI > 14 ar fi excesiv). Substanțele preferate pentru PC sunt aldehida hexil-cinamică 25 % (nr. CAS 101-86-0) și eugenol 25 % (nr. CAS 97-53-0) în acetonă: ulei de măsline (4:1, v/v). Pot exista situații în care, cu o justificare adecvată, este posibil să fie utilizate alte PC care îndeplinesc criteriile de mai sus.

12. În timp ce includerea unui grup PC concomitent este recomandată, pot exista situații în care testarea periodică (la intervale ≤ 6 luni) a PC poate fi adecvată pentru laboratoarele care efectuează LLNA: BrdU-ELISA în mod regulat (efectuează LLNA: BrdU-ELISA cel puțin o dată pe lună) și care dețin o bază de date stabilită cu PC care demonstrează capacitatea laboratorului de a obține rezultate reproductibile și exacte cu PC. Performanța adecvată în ceea ce privește LLNA: BrdU-ELISA poate fi demonstrată cu succes prin generarea de rezultate pozitive consecvente în cazul PC în cel puțin 10 teste independente efectuate pe o perioadă de timp rezonabilă (mai mică de un an).

13. Un PC concomitent trebuie inclus întotdeauna în cazul în care se aduce o modificare procedurală la LLNA: BrdU-ELISA (modificarea personalului instruit, modificarea materialelor și/sau a reactivilor utilizați în metoda de testare, modificarea echipamentului utilizat în metoda de testare, modificarea sursei animalelor de test), iar astfel de modificări trebuie documentate în rapoarte de laborator. Trebuie avut în vedere impactul modificărilor asupra caracterului adecvat al bazei de date istorice constituite anterior în determinarea necesității de a constitui o nouă bază de date istorice pentru a documenta consecvența rezultatelor referitoare la PC.

14. Experimentatorii trebuie să fie conștienți de faptul că decizia de a derula un studiu PC în mod periodic și nu concomitent are consecințe asupra acurateții și acceptabilității rezultatelor negative obținute în urma finalizării unui test fără PC concomitent, în intervalul dintre fiecare test periodic cu PC. De exemplu, dacă se obține un rezultat fals negativ la un test periodic al PC, rezultatele negative ale substanței de test obținute în intervalul dintre ultimul test acceptabil periodic al PC și testul PC periodic inacceptabil pot fi puse sub semnul întrebării. Implicațiile rezultatelor trebuie atent analizate în momentul luării deciziei de a include teste concomitente ale PC sau de a efectua doar teste periodice ale PC. Trebuie avută în vedere, de asemenea, utilizarea unui număr mai mic de animale în grupul PC concomitent în cazul în care acest lucru este justificat științific și dacă laboratorul demonstrează, pe baza datelor istorice specifice laboratorului, că poate fi utilizat un număr mai mic de șoareci (17).

15. Deși substanța utilizată ca martor pozitiv trebuie testată împreună cu un vehicul despre care se știe că va provoca un răspuns constant (de exemplu, acetonă: ulei de măsline; 4:1, v/v), este posibil să existe unele situații prevăzute de lege în care este necesară și testarea cu un vehicul non-standard (preparat cu relevanță clinică/chimică) (18). În cazul în care substanța utilizată ca PC concomitent este testată într-un vehicul diferit față de substanța de test, atunci trebuie inclus un VC separat pentru PC concomitent.

▼M3

16. În cazurile în care se evaluează substanțe de test aparținând unei clase chimice speciale sau care dau rezultate situate într-un anumit interval, substanțele etalon pot, de asemenea, să fie utile pentru a demonstra că metoda de testare funcționează corespunzător pentru detectarea potențialului de sensibilizare dermică al acestor tipuri de substanțe de test. Substanțele etalon adecvate trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

— similaritate structurală și funcțională cu clasa chimică a substanței de test;

— caracteristici fizico-chimice cunoscute;

— date justificative provenind de la LLNA: BrdU-ELISA;

— date justificative provenind de la alte modele animale și/sau de la om.

PROCEDURA DE TESTARE

Număr de animale și doze

17. Fiecare grup tratat trebuie să fie format din minimum patru animale și se folosesc cel puțin trei concentrații ale substanței de test, plus un grup martor negativ tratat numai cu vehiculul utilizat împreună cu substanța de test și un martor pozitiv (paralel sau recent, în funcție de politica laboratorului în ceea ce privește punctele 11-15). Trebuie avută în vedere testarea de doze multiple pe martorul pozitiv, în special dacă testarea grupului martor pozitiv se face pe bază intermitentă. Animalele din grupurile martor trebuie manipulate și tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate, cu excepția faptului că nu li se administrează tratamentul cu substanța de test.

18. Doza și vehiculul se aleg pe baza recomandărilor oferite în referințele 2 și 19. Dozele consecutive se aleg în mod normal dintr-o gamă adecvată de concentrații de 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 % etc. Alegerea seriilor de concentrații utilizate trebuie însoțită de o justificare științifică adecvată. Eventualele date existente privind toxicitatea (de exemplu, toxicitatea acută și iritația dermică) și informații privind structura și caracteristicile fizico-chimice ale substanței de test în cauză (și/sau a substanțelor asociate din punct de vedere structural) trebuie avute în vedere la alegerea celor trei concentrații consecutive, astfel încât cea mai mare concentrație să maximizeze expunerea, evitând în același timp toxicitatea sistemică și/sau iritația dermică locală excesivă (19) (20 și capitolul B.4 din prezenta anexă). În lipsa unor astfel de informații, ar putea fi necesară o metodă preliminară de testare (a se vedea punctele 21-24).

19. Vehiculul nu trebuie să interfereze cu rezultatul testării sau să-l influențeze și trebuie selectat pe baza maximizării solubilității în vederea obținerii celei mai mari concentrații posibile, producând în același timp o soluție/suspensie adecvată pentru aplicarea substanței de test. Vehiculele recomandate sunt acetona: ulei de măsline (4:1, v/v), N,N-dimetilformamidă, metil etil cetonă, propilen glicol și dimetil sulfoxid (6), dar se pot utiliza și altele dacă sunt furnizate justificări științifice suficiente. În anumite situații este posibil să fie necesară utilizarea unui solvent cu relevanță clinică sau a unui preparat comercial sub forma căruia este comercializată substanța de test ca martor suplimentar. Trebuie acordată o atenție specială pentru ca substanțele de test hidrofile să fie încorporate într-un sistem vehicul care să umezească pielea și să nu curgă imediat, prin încorporarea unor dizolvanți adecvați (de exemplu, 1 % Pluronic® L92). Prin urmare, vehiculele formate numai din apă trebuie evitate.

▼M3

20. Prelucrarea ganglionilor limfatici de la șoareci individuali permite evaluarea variabilității inter-animale și o comparare statistică a diferențelor dintre substanța de test și măsurătorile pe grupul martor tratat cu vehicul (a se vedea puncul 33). În plus, evaluarea posibilității de a reduce numărul de șoareci în grupul PC este realizabilă dacă se colectează date individuale referitoare la animale (17). Mai mult, anumite autorități de reglementare solicită colectarea de date individuale referitoare la animale. Colectarea regulată de date specifice fiecărui animal contribuie la bunăstarea animalelor prin evitarea testelor duplicat care ar fi necesare dacă rezultatele obținute în alt mod (de exemplu, cu date colective pentru grupuri de animale) ar trebui ulterior înaintate unor autorități de reglementare cu alte cerințe (de exemplu, furnizarea de date individuale).

Testarea preliminară

21. În absența informațiilor necesare pentru determinarea celei mai mari doze pentru a fi testată (a se vedea punctul 18), trebuie efectuat un test pre-screening pentru a stabili doza adecvată de test în cadrul LLNA: BrdU-ELISA. Scopul testării preliminare este de a furniza orientare în selectarea nivelului maxim al dozei care poate fi utilizat în cadrul studiului principal LLNA: BrdU-ELISA, în cazul în care nu sunt disponibile informații privind concentrația care induce toxicitate sistemică (a se vedea punctul 24) și/sau iritație dermică locală excesivă (a se vedea punctul 23). Doza maximă testată trebuie să fie de 100 % din substanța de test pentru lichide sau concentrația maximă posibilă pentru substanțele solide sau suspensii.

22. Testarea preliminară se derulează în condiții identice cu cele necesare studiului principal LLNA: BrdU-ELISA, cu excepția cazului în care nu există o evaluare a proliferării ganglionilor limfatici și pot fi utilizate mai puține animale în grupul testat. Se recomandă unul sau două animale pe grup testat. Toți șoarecii sunt observați zilnic pentru identificarea semnelor clinice de toxicitate sistemică sau de iritație locală la locul aplicării. Greutatea corporală este consemnată anterior testării preliminare și anterior finalizării acesteia (ziua 6). Ambele urechi ale fiecărui șoarece sunt observate pentru depistarea eritemelor, iar rezultatul se notează în tabelul 1 (20 și capitolul B.4 din prezenta anexă). Măsurătorile privind grosimea urechii sunt efectuate cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii (de exemplu, micrometru digital sau instrumentul de măsurare a grosimii Peacock Dial) în ziua 1 (pre-doză), ziua 3 (după aproximativ 48 de ore de la administrarea primei doze) și în ziua 6. În plus, în ziua 6, grosimea urechii poate fi măsurată pornind de la un eșantion de ureche, prelevat după eutanasierea animalelor. Iritația dermică locală excesivă este indicată printr-un punctaj acordat eritemului de $\geq$ 3 și/sau o creștere a grosimii urechii de cel puțin 25 % în oricare zi a măsurării (21) (22). Cea mai mare doză selectată pentru studiul principal LLNA: BrdU-ELISA este doza imediat inferioară din seria de concentrații (a se vedea punctul 18) care nu induce toxicitate sistemică și/sau iritație dermică locală excesivă.

Tabelul 1

Punctaje acordate eritemelor

Observație	Punctaj
Fără eritem	0
Eritem foarte ușor (abia perceptibil)	1
Eritem bine definit	2

▼M3

Observație	Punctaj
Eritem moderat spre grav	3
Eritem grav (roșu violaceu) cu formare de escare care împiedică punctarea eritemului	4

23. Pe lângă o creștere cu 25 % a grosimii urechii (21) (22), o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a grosimii urechii la șoarecii tratați comparativ cu șoarecii martor a fost, de asemenea, utilizată pentru a identifica substanțele iritante din cadrul LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Cu toate acestea, deși pot surveni creșteri semnificative din punct de vedere statistic atunci când grosimea urechii este sub 25 %, acestea nu au fost asociate în mod specific cu iritația excesivă (25) (26) (27) (28) (29).

24. Următoarele observații clinice pot indica toxicitate sistemică (30) atunci când sunt utilizate ca parte a unei evaluări integrate și, prin urmare, pot indica doza maximă utilizată în studiul LLNA: BrdU-ELISA principal: modificări ale funcției sistemului nervos (de exemplu, piloerecție, ataxie, tremor și convulsii); modificări ale comportamentului (de exemplu, agresivitate, modificări ale activității de curățare, modificare semnificativă a nivelului de activitate); tulburări respiratorii (de exemplu, modificări ale frecvenței și intensității respirației precum dispnee, respirație greoaie și zgomotoasă) și modificări legate de consumul de hrană și apă. În plus, semnele de letargie și/sau lipsa reacției și orice semne clinice indicative ale unei dureri sau suferințe mai mari sau persistente sau o scădere a greutății corporale cu mai mult de 5 % din ziua 1 până în ziua 6, precum și mortalitatea trebuie incluse în evaluare. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită sunt eutanasiate (31).

Schema de tratament a studiului principal

25. Pentru acest test, schema de tratament este următoarea:

— *Ziua 1:* Se identifică și se înregistrează greutatea fiecărui animal în parte, precum și toate observațiile clinice. Se aplică 25 µL de substanță de test diluată în mod adecvat, doar din vehicul sau din PC (concomitent sau recent, în funcție de politica laboratorului cu privire la punctele 11-15), în regiunea dorsală a fiecărei urechi.

— *Zilele 2 și 3:* Se repetă procedura de aplicare efectuată în ziua 1.

— *Ziua 4:* Nu se aplică tratament.

— *Ziua 5:* Se injectează intraperitoneal 0,5 ml (5 mg/șoarece) de soluție BrdU (10 mg/ml).

— *Ziua 6:* Se înregistrează greutatea fiecărui animal și toate observațiile clinice. După aproximativ 24 de ore (24 h) de la injecția cu BrdU, animalele se eutanasiază. Se excizează ganglionii limfatici auriculari de drenare de la fiecare ureche de la toate animalele și se prelucrează separat în soluție tamponată cu fosfat (PBS) pentru fiecare animal. Detalii și diagrame privind identificarea și disecția ganglionilor limfatici pot fi consultate în referința (17). Pentru a monitoriza în continuare răspunsul dermic local în studiul principal, pot fi incluși în protocolul de studiu parametri adiționali precum punctarea eritemului din zona urechii sau măsurări ale grosimii urechii (obținute fie cu ajutorul unui instrument de măsurare a grosimii, fie prin determinări ale greutății eșantioanelor de urechi ulterior necropsiei).

▼M3

Prepararea suspensiilor celulare

26. Pentru fiecare șoarece, se prepară o suspensie de celule izolate provenind din ganglionii limfatici (LNC) excizați bilateral printr-o separare mecanică ușoară realizată cu ajutorul unei site din oțel inoxidabil cu ochiuri de 200 μm sau o altă tehnică acceptabilă de generare a unei singure suspensii celulare (de exemplu, utilizarea unui mojar din plastic de unică folosință pentru a strivi ganglionii limfatici înainte de a-i trece printr-o sită din nylon cu ochiuri de 70 μm). Procedura pentru prepararea suspensiei LNC constituie o etapă crucială în cadrul testului și, prin urmare, trebuie stăpânită în prealabil de către fiecare operator. În plus, ganglionii limfatici prelevați de la animalele din grupul NC sunt mici și, prin urmare, este importantă manipularea cu grijă a acestora pentru a evita orice perturbare a valorilor IS. În orice caz, volumul suspensiei de LNC trebuie să corespundă unui volum optimizat prestabilit (aproximativ 15 ml). Volumul optimizat se bazează pe atingerea unei absorbanțe medii a grupului NC situată între 0,1-0,2.

Determinarea proliferării celulare (măsurarea conținutului de BrdU din ADN-ul limfocitelor)

27. BrdU se măsoară cu ajutorul unui set de măsurare ELISA disponibil în comerț (de exemplu Roche Applied Science, Mannheim, Germania, nr. catalog 11 647 229 001). Pe scurt, se adaugă 100 μl de suspensie de LNC în compartimentele unei microplăci cu baza plată, în triplicate. După fixarea și denaturarea LNC, se adaugă anticorpul anti-BrdU în fiecare compartiment și se lasă să reacționeze. Ulterior, anticorpul anti-BrdU se îndepărtează prin spălare, apoi se adaugă soluția de substrat și se lasă pentru a permite sintetizarea cromogenului. Se măsoară absorbanța la 370 nm cu o lungime de undă de referință fixată la 492 nm. În toate cazurile, condițiile de testare trebuie optimizate (a se vedea punctul 26).

OBSERVAȚII

Observații clinice

28. Fiecare șoarece se examinează atent cel puțin o dată pe zi pentru identificarea oricăror semne clinice, fie de iritații la locul aplicării, fie de toxicitate sistemică. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare șoarece. Planurile de monitorizare trebuie să includă criterii pentru identificarea promptă a șoarecilor care prezintă toxicitate sistemică, iritație dermică locală excesivă sau coroziunea pielii în vederea eutanasierii (31).

Greutatea corporală

29. Astfel cum se arată la punctul 25, greutatea corporală a fiecărui animal se măsoară la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere.

CALCULAREA REZULTATELOR

30. Rezultatele pentru fiecare grup tratat se exprimă printr-un IS mediu. IS se calculează împărțind indicele de marcare BrdU mediu al fiecărui grup tratat cu substanța de test și PC la indicele de marcare BrdU mediu al grupului martor tratat cu solvent/vehicul (VC). IS mediu pentru VC este, prin urmare, egal cu 1.

Indicele de marcare BrdU se calculează după cum urmează:

$$\text{indice de marcare BrdU} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

unde em = lungimea undei de emisie; și ref = lungimea undei de referință.

▼M3

31. Un rezultat este considerat pozitiv atunci când IS ≥ 1,6 (10). Cu toate acestea, intensitatea relației doză-răspuns, semnificația statistică și coerența răspunsurilor obținute cu solvent/vehicul și PC pot fi, de asemenea, utilizate în declararea unui rezultat limită (și anume cu valori ale IS cuprinse între 1,6 și 1,9) ca fiind pozitiv (3) (6) (32).

32. În cazul unui răspuns pozitiv ambiguu cu valori ale IS cuprinse între 1,6 și 1,9, experimentatorii pot examina informații adiționale precum relația doză-răspuns, manifestările de toxicitate sistemică sau iritație excesivă și, dacă este cazul, semnificația statistică împreună cu valorile IS pentru a confirma că astfel de rezultate sunt pozitive (10). Trebuie luate în considerare diferitele proprietăți ale substanței de test, inclusiv o eventuală analogie structurală cu agenți de sensibilizare dermică cunoscuți, declanșarea unei iritații dermice excesive la șoarece și natura relației doză-răspuns observată. Aceste considerații, precum și altele, sunt examinate în detaliu în alt document (4).

33. Colectarea de date pentru fiecare șoarece permite o analiză statistică a existenței și a intensității relației doză-răspuns pe baza datelor. Orice evaluare statistică poate include o evaluare a relației doză-răspuns, precum și comparații între grupurile testate adaptate corespunzător (de exemplu, comparații pe perechi de grupuri de doză cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul). Analizele statistice pot include, de exemplu, o regresie liniară sau testul William pentru evaluarea funcției doză-răspuns, precum și testul Dunnett pentru comparațiile pe perechi. Pentru alegerea metodei adecvate de analiză statistică, experimentatorul trebuie să aibă în vedere posibilele inegalități la nivelul variațelor și alte probleme conexe care ar putea impune o transformare a datelor sau o analiză statistică non-parametrică. În orice caz, experimentatorul ar putea fi nevoit să calculeze indicii de stimulare și să efectueze analizele statistice cu sau fără anumite puncte de date (denumite câteodată „valori aberante”).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

34. Datele se sistematizează sub formă de tabele, indicând indicii de marcare BrdU pentru fiecare animal, media indicilor de marcare BrdU/animal pentru fiecare grup, marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) și IS mediu pentru fiecare grup tratat în raport cu grupul martor concomitent tratat cu solvent/vehicul.

Raportul de testare

35. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de test și cele martor:

— date de identificare (de exemplu, numărul CAS și CE, dacă se cunosc; sursa; puritatea; impuritățile cunoscute; numărul lotului);

— starea fizică și proprietățile fizice și chimice (de exemplu, volatilitate, stabilitate, solubilitate);

— în cazul amestecurilor, compoziția și procentul relativ al fiecărui constituent;

Solvent/vehicul:

— date de identificare (puritate; concentrație, dacă este cazul; volumul utilizat);

— justificarea alegerii vehiculului;

▼M3

Animalele de experiență:

— proveniența șoarecilor de rasa CBA;

— statutul microbiologic al animalelor, dacă se cunoaște;

— numărul și vârsta animalelor;

— sursa animalelor, condițiile de adăpostire, regimul alimentar etc.;

Condiții de testare:

— sursa, numărul lotului, datele furnizate de producător cu privire la asigurarea calității/controlului de calitate (sensibilitatea și specificitatea anticorpilor, limitele de detecție) pentru setul ELISA;

— detalii privind prepararea și aplicarea substanței de testat;

— justificarea dozei alese (inclusiv rezultatele testării preliminare, dacă este cazul);

— concentrațiile vehiculului și ale substanței de test utilizate și cantitatea totală de substanță aplicată;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa regimului alimentar, sursele de apă);

— detalii privind schemele de tratament și de eșantionare;

— metodele de măsurare a toxicității;

— criteriile pentru stabilirea studiilor ca fiind pozitive sau negative;

— detalii privind oricare abateri de protocol și explicații referitoare la modul în care acestea afectează conceptul studiului și rezultatele;

Verificarea fiabilității:

— un rezumat al rezultatelor obținute la ultima verificare a fiabilității, inclusiv informații privind substanța de test, concentrația și vehiculul utilizat;

— rezultatele martorilor specifici laboratorului de testare pentru martorul pozitiv concomitent și/sau istoric, precum și pentru martorul negativ concomitent (solvent/vehicul);

— în cazul în care nu a fost inclus un grup PC concomitent, datele și raportul de laborator pentru cel mai recent grup PC periodic și un raport detaliind datele istorice privind PC specifice laboratorului astfel încât să se justifice de ce nu a fost realizat un grup PC concomitent;

Rezultate:

— greutatea fiecărui animal la începutul testului și în momentul prevăzut pentru eutanasiere, precum și media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) pentru fiecare grup tratat;

— momentul declanșării și semnele de toxicitate, inclusiv iritația dermică la locul administrării, dacă este cazul, pentru fiecare animal;

— un tabel al indicilor de marcare BrdU și cu valorile IS pentru fiecare șoarece și pentru fiecare grup tratat;

— media și marja de eroare asociată (de exemplu, deviația standard, eroarea standard asociată mediei) a indicilor de marcare BrdU/șoarece pentru fiecare grup tratat și rezultatele analizei valorilor aberante în cadrul fiecărui grup tratat;

▼M3

— indicii de stimulare obținuți și determinarea adecvată a variabilității ținând cont de variațiile dintre animale atât în grupurile tratate cu substanța de test, cât și în grupurile martor;

— relația doză-răspuns;

— analize statistice, dacă este cazul;

Discutarea rezultatelor:

— un scurt comentariu privind rezultatele, analiza relației doză-răspuns și analize statistice, dacă este cazul, precum și o concluzie care să indice dacă substanța de test trebuie considerată agent de sensibilizare dermică.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibil la: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Acurateţe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare şi valorile de referinţă acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanţă ale metodei de testare şi unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanţă”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (33).

Substanţă etalon: O substanţă de sensibilizare sau de non-sensibilizare utilizată ca standard pentru comparația cu o substanţă de test. O substanţă etalon ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) sursă (surse) compatibilă (compatibile) şi sigure; (ii) asemănări structurale şi funcționale cu clasa de substanțe care este testată; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; şi (v) influenţă cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Fals negativ: O substanţă de test identificată incorect ca negativă sau inactivă printr-o metodă de testare, ea fiind de fapt pozitivă sau activă (33).

Fals pozitiv: O substanţă de test identificată incorect ca pozitivă sau activă în urma unui test, ea fiind de fapt negativă sau inactivă (33).

Pericol: Potențialul de efect negativ ecologic sau pentru sănătate. Efectul negativ se manifestă doar atunci când există o expunere la un nivel suficient.

Reproductibilitatea inter-laborator: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând acelaşi protocol şi testând aceleaşi substanțe de test, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ şi cantitativ. Reproductibilitatea inter-laborator este determinată în timpul proceselor de pre-validare şi de validare şi indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes inter-laborator, denumită de asemenea, reproductibilitate inter-laborator (33).

Reproductibilitatea intra-laborator: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiaşi laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (33).

Valoare aberantă: O valoare aberantă este o observație considerabil diferită de alte valori în cadrul unui eşantion aleatoriu dintr-o populație.

Asigurarea calităţii: Un proces de management prin care sunt evaluate aderarea la standardele şi cerinţele de testare în laborator, procedurile de păstrare a înregistrărilor şi acurateţea transferului de date de către persoane independente de cele care au efectuat testarea.

Fiabilitate: Măsura în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în acelaşi laborator sau în laboratoare diferite, folosind acelaşi protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilităţii intra-laborator sau inter-laborator (33).

Sensibilizare dermică: Un proces imunologic care rezultă atunci când un individ susceptibil este expus topic la un alergen chimic favorizant care provoacă un răspuns cutanat imun care poate conduce la dezvoltarea unei sensibilizări de contact.

Indice de stimulare (IS): O valoare calculată pentru a evalua potențialul de sensibilizare dermică al unei substanțe de test, şi anume raportul dintre proliferarea înregistrată la grupurile tratate şi cea înregistrată la grupul martor concomitent tratat cu vehicul.

Substanţa de test (denumită, de asemenea, substanţă chimică de test): Orice substanţă sau amestec testat utilizându-se prezenta metodă de testare.

▼M4

B.52. TOXICITATE ACUTĂ PRIN INHALARE – METODA CLASEI DE TOXICITATE ACUTĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 436 (2009) a OCDE. Prima orientare 403 pentru testarea toxicității acute prin inhalare a fost adoptată în 1981, fiind ulterior modificată [a se vedea capitolul B.2 din prezenta anexă (1)]. Dezvoltarea unei metode pentru clasa de toxicitate acută prin inhalare (ATC) (2) (3) (4) a fost considerată necesară în urma revizuirii metodei ATC pe cale orală (capitolul B.1 tris din prezenta anexă) (5). O evaluare retrospectivă a performanței metodei de testare ATC pentru toxicitatea acută prin inhalare a arătat că această metodă poate fi utilizată în scopuri de clasificare și etichetare (6). Metoda de testare ATC prin inhalare va permite utilizarea unei serii succesive de concentrații țintă fixate pentru clasificarea nivelurilor de toxicitate ale unei substanțe chimice testate. Indicatorul cheie de rezultat folosit este letalitatea, totuși animalele care prezintă semne de durere sau suferință profundă sau sunt muribunde ar trebui eutanasiate pentru a li se reduce suferința. Orientări privind efectele etice acceptate sunt disponibile în Ghidul OCDE nr. 19 (7).

2. Orientări privind desfășurarea și interpretarea acestei metode de testare sunt disponibile în Ghidul nr. 39 privind testarea la toxicitate acută prin inhalare (8).

3. Definițiile utilizate în contextul acestei metode de testare sunt disponibile în apendicele 1 și în Ghidul 39 (8).

4. Metoda de testare furnizează informații privind proprietățile periculoase și permite clasificarea substanței chimice testate în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 de clasificare a substanțelor chimice care cauzează toxicitate acută (9). În cazul în care sunt necesare estimări punctuale ale valorilor CL_{50} sau analize ale relației concentrație-răspuns, metoda de testare adecvată este cea prezentată în capitolul B.2 din prezenta anexă (1). Orientări suplimentare privind selecția metodei de testare sunt disponibile în Ghidul 39 (8). Această metodă de testare nu este destinată exclusiv materialelor speciale, cum sunt materialele izometrice sau fibroase puțin solubile sau nanomaterialele fabricate.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Înainte de a aplica această metodă, laboratorul de testare ar trebui să ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța chimică testată, inclusiv rezultatele studiilor existente ale căror date ar susține neefectuarea unor teste suplimentare pentru a reduce la minimum testele pe animale. Informațiile utile în selecția speciei, sușei, sexului, modului de expunere și al concentrațiilor de testare adecvate includ identitatea, structura chimică și proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, rezultatele oricăror teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo*, utilizarea (utilizările) preconizată (preconizate) și potențialul de expunere la om, datele (Q)SAR și datele toxicologice disponibile referitoare la substanțele chimice înrudite cu aceasta din punct de vedere structural. Concentrațiile despre care se știe că provoacă dureri și suferințe profunde din cauza acțiunilor corozive ([1]) sau puternic iritante nu ar trebui testate prin această metodă [a se vedea Ghidul 39 (8)].

([1]) Caracterul coroziv poate fi stabilit de experți pe baza următoarelor: semne observate la oameni și animale, date (in vitro) existente – de exemplu, capitolele B.40 (10), B.40 bis (11) din prezenta anexă sau orientarea nr. 435 a OCDE (12), valorile pH-ului, informații privind substanțe chimice similare sau orice alte date relevante.

▼M4

PRINCIPIUL TESTULUI

6. Conform principiului acestui test, clasificarea substanței chimice testate este posibilă atunci când au fost obținute informații suficiente privind toxicitatea acută prin inhalare a acesteia pe parcursul unei perioade de expunere de 4 ore. Perioadele de expunere pot varia în funcție de obiectivele de reglementare. Pentru fiecare nivel de concentrație se testează câte trei animale din fiecare sex. În funcție de mortalitatea și/sau starea muribundă a animalelor, pot fi suficiente două etape pentru a determina toxicitatea acută a substanței chimice testate. Dacă există indicii că animalele de un anumit sex sunt mai susceptibile decât celălalt sex, testul poate continua numai pe animalele susceptibile. Rezultatele obținute în etapa anterioară vor determina etapa următoare și anume:

(a) nu mai sunt necesare teste suplimentare;

(b) se testează câte trei animale din fiecare sex; sau

(c) se testează numai 6 animale având sexul care s-a dovedit a fi cel mai susceptibil, adică estimările limitei inferioare ale clasei de toxicitate ar trebui să se bazeze pe șase animale din fiecare grup de testare a concentrației, indiferent de sex.

7. Animalele muribunde sau cele care manifestă dureri evidente sau prezintă semne de suferință gravă și prelungită ar trebui eutanasiate și sunt luate în considerare la interpretarea rezultatelor în aceeași măsură cu animalele care au murit în timpul testului. Criteriile pentru luarea deciziei de eutanasiere a animalelor muribunde sau care suferă profund și indicațiile pentru recunoașterea decesului previzibil sau iminent fac obiectul *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (7).

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

8. Ar trebui utilizate animale adulte, tinere, sănătoase provenind din sușele utilizate în mod obișnuit în laboratoare. Specia preferată este șobolanul, iar orice utilizare a unei specii diferite ar trebui justificată.

Pregătirea animalelor

9. Femelele ar trebui să fie nulipare și să nu fie gestante. În ziua expunerii, animalele ar trebui să fie adulte, cu vârsta cuprinsă între 8 și 12 săptămâni, iar greutatea corporală ar trebui să se situeze în limita a ± 20 % din greutatea medie a animalelor de ambele sex expuse anterior la aceeași vârstă. Animalele se selectează aleatoriu și se marchează pentru a putea fi identificate individual. Animalele sunt ținute în cuști timp de minimum cinci zile înainte de începerea testului, pentru a permite aclimatizarea la condițiile de laborator. De asemenea, animalele ar trebui obișnuite cu dispozitivele de testare cu puțin timp înainte de testare, deoarece aceasta va atenua stresul provocat de introducerea în noul mediu.

Creșterea animalelor

10. Temperatura spațiului în care sunt ținute animalele utilizate în scopuri experimentale ar trebui să fie de 22 °C ± 3 °C. Umiditatea relativă ar trebui menținută în intervalul optim de 30-70 %, deși acest lucru ar putea să nu fie posibil atunci când vehiculul utilizat este apa. În general, înainte și după expuneri, animalele ar trebui să fie închise în cuști, în grupuri de același sex și cu aceeași concentrație, însă numărul de animale din cușcă ar trebui selectat astfel să permită observarea ușoară a fiecărui exemplar și să reducă la minim pierderile provocate de canibalism și luptele dintre animale. Atunci când animalele urmează a fi expuse numai în zona nasului, poate fi necesară aclimatizarea lor prealabilă cu tuburile de imobilizare. Tuburile de imobilizare nu ar trebui să provoace stres fizic, termic sau

▼M4

de imobilizare asupra animalelor. Dispozitivele de imobilizare pot afecta date fiziologice finale, cum sunt temperatura corporală (hipertermie) și/sau volumul respirator pe minut. Dacă sunt disponibile date generice care demonstrează că nu apar modificări semnificative de acest tip, pre-aclimatizarea cu tuburile de imobilizare nu este necesară. Animalele expuse cu întregul corp la un aerosol ar trebui să fie adăpostite individual pe durata expunerii, pentru a preveni filtrarea aerosolilor testați prin blana celorlalte animale din cușcă. Se poate utiliza hrană convențională și certificată de laborator, cu excepția perioadelor de expunere, însoțită de asigurarea unei cantități nelimitate de apă de băut de la rețeaua publică. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric.

Incintele de inhalare

11. Incintele de inhalare ar trebui să fie selectate în funcție de natura substanței chimice testate și obiectivul testului. Modul preferat de expunere este numai în zona nasului (termen care include expunerea numai în zona „a capului”, „a nasului” sau „a botului”). Expunerea numai în zona nasului este în general preferată în studiile cu expunere la aerosoli lichizi sau solizi sau la vapori care se pot condensa și forma aerosoli. Unele obiective speciale ale studiului pot fi atinse mai eficient prin expunerea întregului corp, dar această metodă ar trebui să fie justificată în raportul studiului. Pentru a asigura stabilitatea atmosferei din incinta pentru expunere a întregului corp, volumul total al animalelor utilizate în scopuri experimentale nu ar trebui să depășească 5 % din volumul incintei. Principiile tehnicilor de expunere exclusiv în zona nasului și a întregului corp și avantajele și dezavantajele specifice ale acestora sunt descrise în Ghidul 39 (8).

CONDIȚII DE EXPUNERE

Administrarea concentrațiilor

12. Perioada recomandată de expunere este de patru ore, fără a include perioada de echilibrare. Pentru satisfacerea anumitor cerințe poate fi necesară utilizarea unor perioade diferite, totuși acestea ar trebui să fie justificate în raportul studiului [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Animalele expuse în incintele pentru expunerea întregului corp ar trebui adăpostite individual, pentru a preveni ingestia substanței chimice testate în urma toaletării celorlalte animale din aceeași cușcă. Animalele nu ar trebui să fie hrănite pe perioada de expunere a întregului corp. Apa poate fi furnizată pe tot parcursul expunerii întregului corp.

13. Animalele sunt expuse la substanța chimică testată sub formă de gaz, vapori, aerosoli sau un amestec al acestora. Starea fizică a care urmează a fi testată depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate, de concentrația selectată și/sau de forma fizică cea mai probabilă din timpul manipulării și utilizării acesteia. Substanțele chimice testate higroscopice și reactive din punct de vedere chimic ar trebui testate în condiții de aer uscat. Ar trebui să se evite generarea unor concentrații cu risc de explozie.

Distribuția granulometrică

14. Ar trebui măsurată dimensiunea particulelor pentru toți aerosolii și vaporii care pot condensa și forma aerosoli. Pentru a permite expunerea tuturor zonelor relevante ale tractului respirator, sunt recomandați aerosoli cu diametre aerodinamice mediane masice ale particulelor (DAMM) cuprins între 1 și 4 μm și cu o abatere geometrică standard (σ_g) situată intervalul 1,5-3 (8) (13) (14). Deși ar trebui depuse eforturi rezonabile pentru satisfacerea acestui standard, în cazul în care acesta nu poate fi obținut ar trebui prezentată o apreciere bazată pe experiență. De exemplu, particulele vaporilor de metale pot avea dimensiuni sub acest standard, în timp ce particulele încărcate, fibrele și materialele higroscopice (a căror dimensiune crește în mediul umed din tractul respirator) pot depăși dimensiunile acestui standard.

▼M4

Prepararea substanței chimice testate într-un vehicul

15. Este posibilă utilizarea unei vehicul pentru a genera o concentrație și dimensiune a adecvată a particulelor substanței chimice testate în atmosferă. De regulă, vehiculul preferat este apa. Particulele pot fi supuse la procese mecanice pentru a ajunge la distribuția granulometrică necesară, dar ar trebui avut grijă să se evite descompunerea sau modificarea substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au modificat compoziția substanței chimice testate (de exemplu, temperaturi extreme ca urmare a măcinării excesive prin fricțiune), compoziția substanței chimice testate ar trebui verificată analitic. Ar trebui să se acorde atenție deosebită pentru a se evita contaminarea substanței chimice testate. Nu este necesară testarea materialelor granulare nefriabile a căror formulare nu permite inhalarea. Ar trebui realizat un test de măcinare pentru a demonstra că în timpul manipulării materialelor granulare nu se produc particule respirabile. Dacă un test de măcinare produce particule respirabile, ar trebui efectuat un test de toxicitate prin inhalare.

Animale martor

16. Nu este necesar un grup paralel de martori negativi (aer). Atunci când pentru generarea atmosferei testului se utilizează un alt vehicul decât apa, ar trebui folosit un grup martor pentru vehicul numai în cazul în care nu sunt disponibile date istorice privind toxicitatea prin inhalare. Dacă un studiu privind toxicitatea unei substanțe chimice testate care a fost introdusă într-un vehicul nu identifică urme de toxicitate, se deduce că vehiculul nu este toxic la concentrația testată; prin urmare, nu este necesar un grup martor pentru vehicul.

MONITORIZAREA CONDIȚIILOR DE EXPUNERE

Alimentarea cu aer a incintei

17. Debitul de aer în incintă ar trebui să fie controlat cu atenție, monitorizat în mod continuu și înregistrat cel puțin o dată pe oră în timpul fiecărei expuneri. Monitorizarea concentrației (sau stabilității) atmosferei de testare reprezintă o măsură integrală a tuturor parametrilor dinamici și oferă un mijloc indirect de a controla toți parametrii dinamici relevanți de generare a atmosferei. Ar trebui acordată o deosebită atenție evitării re-inhalării în incintele de inhalare numai în zona nasului, în cazurile în care debitul de aer asigurat de sistemul de expunere este insuficient pentru a asigura un flux dinamic al atmosferei conținând substanța chimică testată. Există metodologii care pot fi utilizate pentru a demonstra lipsa re-inhalării în condițiile de operare selectate (8) (15). Concentrația de oxigen ar trebui să fie de cel puțin 19 %, iar concentrația de dioxid de carbon nu ar trebui să depășească 1 %. Dacă există motive să se considere că aceste standarde nu pot fi satisfăcute, concentrațiile de oxigen și dioxid de carbon ar trebui să fie măsurate.

Temperatura și umiditatea relativă a incintei

18. Temperatura incintei se menține la 22 °C ± 3 °C. Umiditatea relativă în zona de respirație a animalelor cu expunere numai în zona nasului sau a întregului corp se monitorizează și se înregistrează de cel puțin trei ori, pentru perioadele de expunere de până la patru ore, și o dată pe oră, în cazul perioadelor mai scurte. Umiditatea relativă ar trebui menținută în intervalul optim de 30-70 %, dar un asemenea nivel fi dificil de atins (de exemplu, atunci când se testează amestecuri conținând apă) sau de măsurat, ca urmare a interferențelor dintre substanța chimică testată și metoda de testare.

▼M4

Substanța chimică testată: concentrația nominală

19. Dacă este posibil, concentrația nominală de expunere în incintă ar trebui calculată și înregistrată. Concentrația nominală constă în masa substanței chimice testate generate, împărțită la volumul total de aer care a circulat prin sistemul incintei. Deși concentrația nominală nu este utilizată pentru a caracteriza expunerea animalelor, însă o comparare a acesteia cu concentrația efectivă oferă indicații privind eficiența de generare a sistemului de testare și, astfel, poate fi utilizată pentru a identifica eventualele probleme de generare.

Substanța chimică testată: concentrația reală

20. Concentrația efectivă este reprezentată de concentrația substanței chimice testate în zona de respirație a animalului din incinta de inhalare. Concentrațiile efective pot fi obținute prin metode specifice (de exemplu, prelevare directă, adsorbție sau reacții chimice și caracterizare analitică ulterioară) sau nespecifice, cum este analiza filtrului gravimetric. Utilizarea analizei gravimetrice este acceptată numai pentru aerosolii sub formă de pulbere cu o singură componentă sau pentru aerosolii lichidelor cu volatilitate redusă și ar trebui să fie susținută de caracterizări prealabile adecvate specifice pentru substanțele testate. Concentrația aerosolilor sub formă de pulbere cu componente multiple poate fi determinată, de asemenea, prin analiză gravimetrică. Totuși, o astfel de analiză necesită date analitice care să demonstreze că materialul aflat în suspensie aer are aceeași compoziție ca materialul inițial. Dacă aceste informații nu sunt disponibile, poate fi necesară o nouă analiză a substanței chimice testate (în mod ideal, în starea sa în suspensie în aer) la intervale regulate pe durata studiului. În cazul agenților transformați în aerosoli care se pot evapora sau pot sublima, ar trebui demonstrat că toate fazele au fost prelevate prin metoda selectată. Concentrațiile țintă, nominale și efective ar trebui indicate în raportul studiului, dar numai concentrațiile efective sunt utilizate pentru a calcula valorile concentrației letale din analizele statistice.

21. Dacă este posibil, se va utiliza un singur lot de substanță chimică testată, iar proba testată ar trebui păstrată în condiții care să îi asigure puritatea, omogenitatea și stabilitatea. Înainte de începerea studiului, substanța chimică testată ar trebui să fie caracterizată atât în ceea ce privește puritatea, cât și, în limita posibilităților tehnice, identitatea, cantitățile de contaminați identificați și de impurități. Aceasta poate fi demonstrată de, dar nu se limitează la următoarele date: timpul de retenție și suprafața relativă a vârfului, greutatea moleculară obținută prin analize de spectroscopie de masă sau de cromatografie în fază gazoasă sau prin alte estimări. Chiar dacă laboratorul de testare nu are obligația de a stabili identitatea probei testate, acesta ar trebui să confirme cel puțin parțial caracterizarea oferită de sponsor (de exemplu, culoare, caracteristici fizice etc.).

22. Atmosfera de expunere este menținută la un nivel cât mai constant posibil și monitorizată permanent și/sau intermitent, în funcție de metoda de analiză. Atunci când prelevarea probelor se desfășoară în mod intermitent, ar trebui prelevate probe din atmosfera incintei cel puțin de două ori pe durata unui studiu de patru ore. Dacă acest lucru nu este posibil din cauza debitului limitat de aer sau a nivelului redus al concentrațiilor, se poate preleva o singură probă pentru întreaga perioadă de expunere. În cazul în care apar fluctuații semnificative între probe, următoarele concentrații testate ar trebui să utilizeze patru probe pentru fiecare expunere. Nicio probă a concentrației din incintă nu ar trebui să se abată de la concentrația medie a incintei cu mai mult de ± 10 % în cazul gazelor și vaporilor și cu mai mult de ± 20 % în cazul aerosolilor lichizi sau solizi. Perioada până la atingerea echilibrului în incintă (t_{95}) ar trebui calculată și înregistrată. Durata de expunere cuprinde perioada de generare a substanței chimice testate, inclusiv perioada necesară pentru atingerea t_{95}. Orientări privind estimarea t_{95} sunt disponibile în Ghidul 39 (8).

▼M4

23. Fiecare fază a amestecurilor foarte complexe formate din vapori/gaze și aerosoli (de exemplu, atmosfere de combustie și substanțe chimice testate evacuate din produse/dispozitive specializate finale) poate avea un comportament diferit într-o incintă de inhalare, astfel încât ar trebui selectată cel puțin o substanță-indicator (analit) a fiecărei faze (vapori/gaz și aerosol), de obicei substanța activă principală a amestecului. Atunci când substanța chimică testată constă într-un amestec, concentrația analitică ar trebui raportată pentru amestecul total, nu doar pentru ingredientul activ al componentei (analit). Informații suplimentare privind concentrațiile efective sunt disponibile în Ghidul 39 (8).

Substanța chimică testată: distribuția granulometrică

24. Distribuția granulometrică a aerosolilor ar trebui să fie determinată de cel puțin două ori în timpul fiecărei durate de expunere de patru ore, cu ajutorul unui impactor în cascadă sau a unui instrument alternativ, cum ar fi un separator de particule aerodinamice. Dacă echivalența rezultatelor obținute cu ajutorul impactorului în cascadă sau a instrumentului alternativ poate fi demonstrată, instrumentul alternativ poate fi utilizat pe durata întregului studiu. Eficiența de colectare a instrumentului principal poate fi confirmată prin utilizarea în paralel cu un al doilea dispozitiv, precum un filtru gravimetric sau un impactor/barbotor de gaze. Concentrația masică obținută prin analiza dimensiunii particulelor ar trebui să difere într-o marjă rezonabilă de limitele concentrațiilor masice obținute prin analiza filtrului [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Dacă echivalența poate fi demonstrată încă din primele etape ale studiului, măsurările de confirmare suplimentare pot fi omise. Din motive de protecție a bunăstării animalelor, se vor lua măsuri pentru a reduce la minimum cantitatea de date neconcludente care poate obliga la repetarea expunerii. Determinarea dimensiunii particulelor ar trebui realizată pentru vapori atunci când condensarea acestora poate conduce la formarea unui aerosol sau dacă sunt detectate particule într-o atmosferă de vapori cu potențial de amestec al fazelor (a se vedea punctul 14).

PROCEDURĂ

Testul principal

25. În fiecare etapă se utilizează trei animale de fiecare sex sau șase animale având sexul care s-a dovedit cel mai susceptibil. Dacă speciile de rozătoare, altele decât șobolanii, sunt expuse numai în zona nasului, duratele maxime de expunere pot fi modificate pentru a reduce la minimum nivelurile de suferință specifice speciei. Nivelul concentrației primei doze se selectează din cele patru niveluri fixate și ar trebui să fie cel mai susceptibil să producă toxicitate la unele din animalele expuse. Schemele de testare pentru gaze, vapori și aerosoli (incluse în apendicele 2-4) reprezintă testele cu valorile limită pentru categoriile CLP 1-4 (9) pentru gaze (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (apendicele 2), pentru vapori (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (apendicele 3) și pentru aerosoli (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (apendicele 4). Categoria 5, care nu este prevăzută în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9), se referă la concentrații care depășesc respectivele concentrații limită. Pentru fiecare concentrație inițială se aplică schema corespunzătoare. În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, se urmează procedura de testare indicată prin săgeți până la stabilirea unei categorii.

26. Intervalul de timp dintre administrarea dozelor la grupurile expuse se determină în funcție de momentul declanșării, durata și severitatea semnelor de toxicitate. Expunerea animalelor la următorul nivel de concentrație se amână până când există o certitudine rezonabilă că animalele testate anterior vor supraviețui. Se recomandă un interval de 3 sau 4 zile între expunerile la fiecare nivel de concentrație, pentru a permite observarea toxicității întârziate. Intervalul de timp poate fi adaptat după caz, de exemplu în cazul unor rezultate neconcludente.

▼M4

Testul la valori-limită

27. Testul la valori-limită se utilizează atunci când substanța chimică testată este cunoscută sau considerată ca fiind practic netoxică, adică atunci când are efecte toxice numai la o concentrație peste limita reglementată. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate pot fi obținute pe baza datelor cunoscute despre substanțe și amestecuri similare testate, ținând seama de identitatea și procentajul componentelor cunoscute ca fiind semnificative din punct de vedere toxicologic. În situațiile în care nu există sau există puține informații privind toxicitatea materialului sau în care se estimează că substanța chimică testată este toxică, se efectuează testul principal [orientări suplimentare sunt disponibile în Ghidul 39 (8)].

28. Când se utilizează procedura normală, trei animale pentru fiecare sex sau șase animale de sexul dovedit cel mai susceptibil sunt expuse la concentrații de 20 000 ppm pentru gaze, 20 mg/l pentru vapori și 5 mg/l pentru pulberi/aburi (dacă este posibil), care reprezintă valorile limită ale acestei metode de testare. În cazul testării aerosolilor, principalul obiectiv ar trebui să fie obținerea unor particule de dimensiuni respirabile (de exemplu, DAMM de 1-4 μm). Acest lucru este posibil pentru majoritatea substanțelor testate la o concentrație de 2 mg/l. Testarea aerosolilor la o valoare peste 2 mg/l ar trebui efectuată numai atunci când pot fi obținute particule de dimensiuni respirabile [a se vedea Ghidul 39 (8)]. Conform GHS (16), din motive de asigurare a bunăstării animalelor, testarea peste valoarea concentrației-limită nu este recomandată. Testarea în categoria GHS 5 (16), care nu este prevăzută în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9), ar trebui să fie luată în considerare doar atunci când este foarte probabil ca rezultatele acestor teste să fie de interes direct pentru protecția sănătății oamenilor și animalelor și ar trebui să fie justificată în raportul studiului. În cazul substanțelor de test cu risc de explozie, vor fi luate toate măsurile pentru a se evita întrunirea condițiilor favorabile unei explozii. Pentru a evita utilizarea inutilă a animalelor, se va efectua un test prealabil fără animale, anterior testului la valorile limită, pentru a se verifica satisfacerea condițiilor din incintă.

OBSERVAȚII

29. Animalele ar trebui observate frecvent din punct de vedere clinic în perioada de expunere. După expunere, observațiile clinice ar trebui efectuate de cel puțin două ori în ziua expunerii sau mai frecvent, în funcție de reacția animalelor la tratament, apoi de cel puțin o dată pe zi, pentru o perioadă totală de 14 zile. Perioada de observație nu este fixă, însă ar trebui determinată în funcție de tipul și momentul apariției semnelor clinice și de durata perioadei de recuperare. Momentele la care semnele de toxicitate apar și dispar sunt importante, în special în cazurile în care acestea au tendința de a apărea cu întârziere. Toate observațiile se consemnează sistematic în înregistrările individuale pentru fiecare animal. Din motive de protecție a bunăstării acestora, animalele găsite în stare muribundă și care manifestă dureri mari și/sau semne prelungite de suferință profundă ar trebui eutanasiate. Atunci când se efectuează examinări privind semnele clinice de toxicitate, starea defavorabilă inițială și modificările respiratorii temporare în urma expunerii nu ar trebui să fie confundate cu efectele tratamentului. Se iau în considerare principiile și criteriile rezumate în ghidul privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (7). În cazul în care animalele sunt eutanasiate sau sunt găsite moarte, momentul morții se înregistrează cât mai exact posibil.

▼M4

30. Observațiile asupra animalelor din cuști vizează modificările blănii și pielii, ochilor și mucoaselor, membranelor și, de asemenea, ale sistemelor respirator, circulator, vegetativ și nervos central, precum și ale activității somato-motorii și a comportamentului. Dacă este posibil, se înregistrează fiecare diferență între efectele locale și sistemice. Se va acorda o atenție specială observării tremuratului, convulsiilor, salivării, diareii, letargiei, somnului și comei. Măsurarea temperaturii rectale poate oferi indicii de susținere privind bradipneea reflexă sau hipo/hipertermia asociate condițiilor de tratament sau de captivitate.

Greutatea corporală

31. Greutatea corporală a fiecărui animal ar trebui să fie înregistrată o dată pe zi pe durata perioadei de aclimatizare, imediat înainte de expunere (ziua 0) și cel puțin în zilele 1, 3 și 7 (apoi săptămânal), precum și în momentul morții sau al eutanasierii, dacă acestea au loc după prima zi. Greutatea corporală este recunoscută ca indicator critic al toxicității, iar animalele care prezintă o scădere susținută de ≥ 20 % comparativ cu valorile anterioare studiului ar trebui să fie atent monitorizate. Animalele care au supraviețuit sunt cântărite și eutanasiate la sfârșitul perioadei de post-expunere.

Patologia

32. Toate animalele participante la test, inclusiv cele care mor în cursul testului sau sunt eutanasiate și eliminate din studiu din motive de protecție a bunăstării animalelor, ar trebui să fie supuse unei autopsii. Dacă autopsia nu poate fi efectuată imediat după descoperirea animalului mort, acesta ar trebui să fie refrigerat (nu congelat) la temperaturi suficient de joase pentru a minimiza autoliza. Autopsiile ar trebui efectuate cât mai repede posibil, de obicei în termen de 1-2 zile. Ar trebui înregistrate toate modificările patologice macroscopice intervenite la fiecare animal, fiind acordată o atenție specială modificărilor tractului respirator.

33. Pot fi efectuate examinări suplimentare, incluse *a priori* în proiect, dacă acestea sunt considerate necesare pentru a spori valoarea interpretativă a studiului, cum sunt cântărirea plămânilor șobolanilor supraviețuitori și/sau identificarea iritațiilor prin examinare microscopică a tractului respirator. Organele examinate le pot include pe cele care prezintă semne de modificări patologice macroscopice, provenite de la animalele care au supraviețuit cel puțin 24 de ore, precum și organele despre care se știe sau se consideră că au fost afectate. Examinarea microscopică a întregului tract respirator poate furniza informații utile privind substanțele chimice care produc reacții la contactul cu apa, cum sunt acizii și substanțele higroscopice.

DATE ȘI RAPORT

Date

34. Ar trebui furnizate date privind greutatea corporală și rezultatele autopsiei fiecărui animal. Observațiile clinice se rezumă în format tabelar, indicând pentru fiecare grup testat numărul de animale utilizate, numărul de animale care au prezentat semne specifice de toxicitate, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, ora decesului pentru fiecare animal, o descriere și evoluția în timp și reversibilitatea efectelor toxice și rezultatele autopsiei.

▼M4

Raportul de testare

35. Raportul de testare ar trebui să includă următoarele informații, după caz:

Animalele testate și îngrijirea lor

— descrierea condițiilor de captivitate, inclusiv: numărul (sau modificarea numărului) animalelor din fiecare cușcă, materialul pentru așternut, temperatura ambiantă și umiditatea relativă, perioada de expunere la lumină și alimentația;

— specia/sușa utilizată și justificarea utilizării altor specii decât șobolanul;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— metoda de repartizare aleatorie;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv tipul/sursa de alimentație, sursa de apă);

— descrierea tuturor condițiilor anterioare testului, inclusiv alimentație, carantină și tratarea unor boli.

Substanța chimică testată

— natura fizică, puritate și, dacă este cazul, proprietăți fizico-chimice (inclusiv izomerizare);

— datele de identificare și numărul din registrul Chemical Abstract Service (CAS), dacă este cunoscut.

Vehiculul

— justificarea utilizării unui vehicul și a vehiculului ales (dacă este altul decât apa);

— date istorice și de confirmare care demonstrează că vehiculul nu afectează rezultatul studiului.

Incinta de inhalare

— descrierea incintei de inhalare, inclusiv dimensiunile și volumul acesteia;

— sursa și descrierea echipamentului utilizat pentru expunerea animalelor, precum și pentru generarea atmosferei;

— echipamentele de măsurare a temperaturii, umidității, dimensiunii particulelor și concentrației efective;

— sursa de aer, modul de tratare a aerului introdus/extras și sistemul de condiționare;

— metodele utilizate pentru calibrarea echipamentelor pentru asigurarea unei atmosfere omogene de testare;

— diferențele de presiune (pozitive sau negative);

— orificiile de expunere ale incintei (pentru expunere la nivelul nasului); locul animalelor în sistem (pentru expunerea întregului corp);

— omogenitatea temporală/stabilitatea atmosferei de testare;

— amplasarea senzorilor de temperatură și umiditate și prelevarea probelor din atmosfera de testare din incintă;

— debitele de aer, debitul de aer/orificiul de expunere (pentru expunere la nivelul nasului) sau greutatea animalului/incintă (pentru expunerea întregului corp);

— informații privind aparatele de măsurare a nivelului de oxigen și dioxid de carbon, după caz;

▼M4

— perioada necesară pentru atingerea echilibrului în incinta de inhalare (t_{95});

— numărul modificărilor de volum pe oră;

— dispozitivele de contorizare (după caz).

Date privind expunerea

— justificarea concentrației țintă selectată pentru studiul principal;

— concentrațiile nominale (masa totală a substanței chimice testate generate în incinta de inhalare împărțită la volumul total de aer care a circulat prin incintă);

— concentrațiile efective ale substanței chimice testate care au fost prelevate din zona de respirație a animalelor; în cazul amestecurilor testate care produc forme fizice eterogene (gaze, vapori, aerosoli), acestea pot fi analizate separat;

— toate concentrațiile în aer ar trebui raportate separat, în unități de masă (de exemplu, mg/l, mg/m^3 etc.), iar unitățile de volum (de exemplu, ppm, ppb) pot fi indicate și între paranteze;

— distribuția granulometrică, diametrul aerodinamic median masic al particulelor (DAMM) și abaterea geometrică standard (σ_g), inclusiv metodele de calcul ale acestora. analizele granulometrice individuale ar trebui să fie raportate.

Condițiile de testare

— detalii privind preparatul substanței chimice testate, inclusiv detalii referitoare la orice procedură utilizată pentru reducerea dimensiunii particulelor substanțelor solide sau prepararea soluțiilor substanței chimice testate. În cazurile în care se consideră că procesele mecanice au modificat compoziția substanței chimice testate, se includ rezultatele analizelor de verificare a acesteia;

— o descriere (preferabil însoțită de o diagramă) a echipamentului utilizat pentru generarea atmosferei de testare și expunerea animalelor la aceasta;

— detalii privind metoda de chimie analitică utilizată și validarea metodei (inclusiv eficiența recuperării substanței chimice testate din mediul de prelevare);

— justificarea selectării concentrațiilor testate.

Rezultate

— prezentarea sub formă tabelară a temperaturii, umidității și debitului de aer din incintă;

— prezentarea sub formă tabelară a concentrației nominale și efective din incintă;

— prezentarea sub formă tabelară a dimensiunii particulelor, inclusiv date analitice privind prelevarea probelor, distribuția granulometrică și calculele DAMM și σ_g;

— prezentarea sub formă tabelară a datelor privind răspunsul și nivelul concentrației la fiecare animal (animale care prezintă semne de toxicitate, inclusiv mortalitatea, natura, gravitatea și durata efectelor);

— greutatea corporală a fiecărui animal în perioada studiului, data și ora morții, dacă aceasta are loc anterior eutanasierii; apariția și evoluția semnelor de toxicitate și reversibilitatea acestora pentru fiecare animal;

▼M4

— rezultatele autopsiei și ale examenului histopatologic pentru fiecare animal, dacă sunt disponibile;

— categoria CLP și valoarea limită CL_{50}.

Discutarea și interpretarea rezultatelor

— ar trebui să se pună un accent deosebit asupra descrierii metodelor utilizate pentru satisfacerea criteriilor acestei metode de testare, de exemplu concentrația limită sau dimensiunea particulelor;

— ar trebui tratată respirabilitatea particulelor în contextul rezultatelor generale, în special atunci când criteriile privind dimensiunile particulelor nu au putut fi satisfăcute;

— consecvența metodelor utilizate pentru determinarea concentrațiilor nominale și efective și relația dintre concentrația efectivă și concentrația nominală ar trebui incluse în evaluarea generală a studiului;

— ar trebui tratată cauza probabilă a morții și modul predominant de acțiune (sistemic sau local);

— eutanasierea animalelor care prezentau semne de durere și suferință gravă și îndelungată ar trebui justificată în conformitate cu criteriile prevăzute de Ghidul OCDE privind punctele finale din considerente umane în experimentele cu animale (7).

BIBLIOGRAFIE:

(1) Capitolul B.2 din prezenta anexă, „Toxicitate acută (administrare prin inhalare)”.

(2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., and Schlede E. (2003), Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System, Arch. Toxicol. 77: 243-254.

(3) Diener W., Kayser D. and Schlede E. (1997), The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations, Arch. Toxicol. 71: 537-549.

(4) Diener W. and Schlede E. (1999), Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests, *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Capitolul B.1 tris din prezenta anexă, „Toxicitate orală acută – Metoda clasei de toxicitate acută”.

(6) OECD (2009), Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(7) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(8) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(9) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 (JO L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testul rezistenței electrice transcutanate (RET)”.

(11) Capitolul B.40 din prezenta anexă, „Coroziunea cutanată *in vitro*: Testare pe un model de piele umană”.

(12) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibil la adresa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(13) Phalen R.F. (2009), Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992), Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT), Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests, Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(15) Pauluhn J. and Thiel A. (2007), A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers, J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibil la adresa: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚIE

Substanța chimică testată: Orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼**M4**

Apendicele 2

Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru gaze (ppm/4h)

Observații generale ([1])

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare, astfel cum sunt conținute în prezentul apendice.

Apendicele 2a: concentrația inițială este 100 ppm.

Apendicele 2b: concentrația inițială este 500 ppm.

Apendicele 2c: concentrația inițială este 2 500 ppm.

Apendicele 2d: concentrația inițială este 20 000 ppm.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

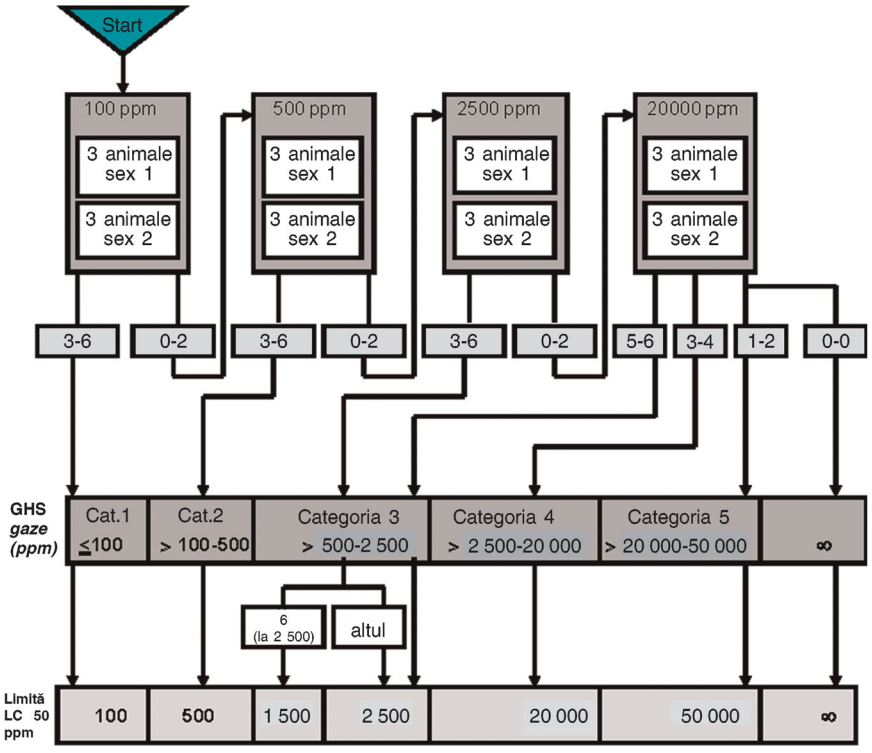
([1]) În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul Toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼M4

Apendicele 2a

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 100 ppm/4 h pentru gaze



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

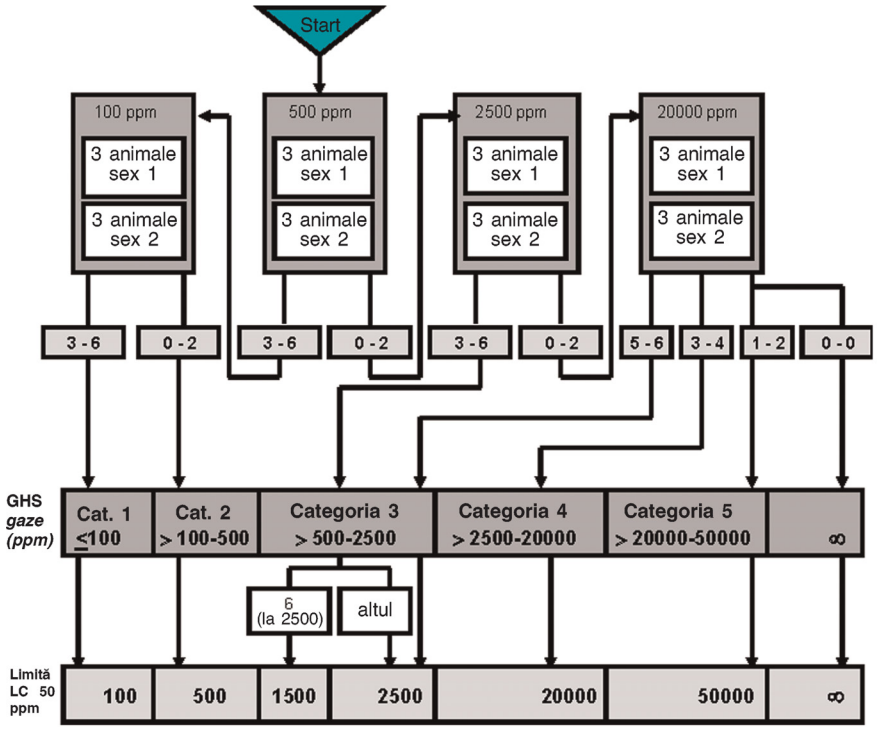
— Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 2b

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 500 ppm/4h pentru gaze



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

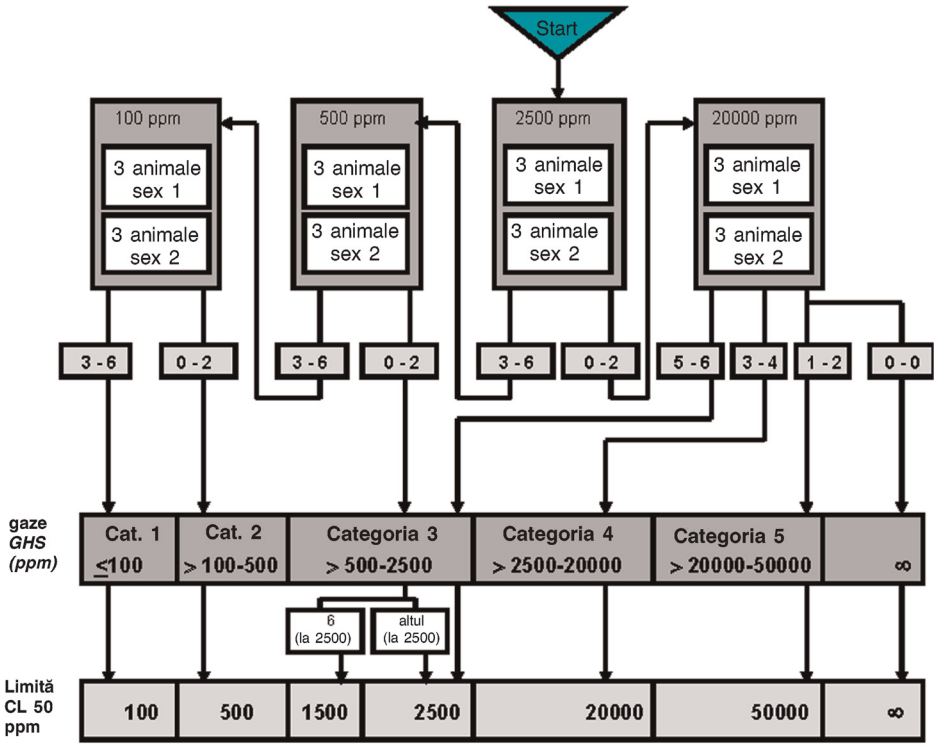
— Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 2c

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 2 500 ppm/4h pentru gaze



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0–6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

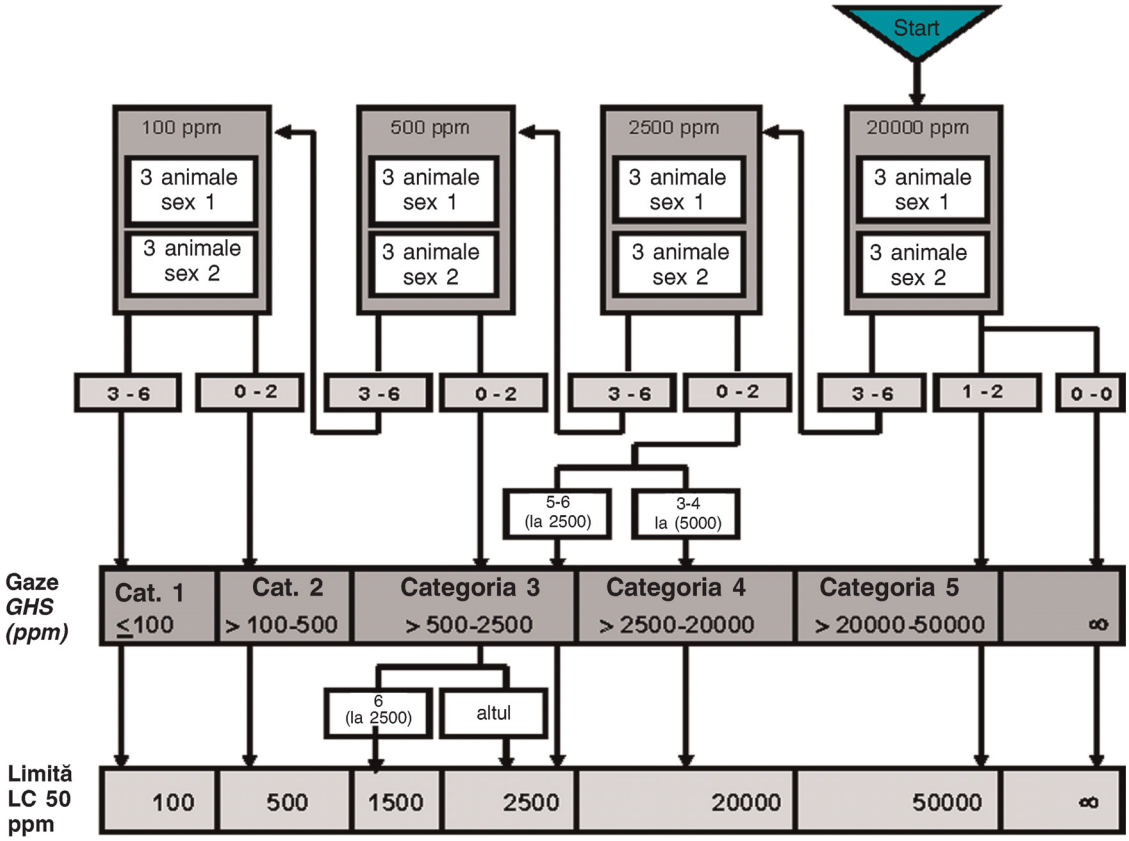
— Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 2d

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 20 000 ppm/4h pentru gaze



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

— Testare la ≥ 20 000 ppm/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼**M4**

Apendicele 3

Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru vapori (mg/L/4h)

Observații generale ([1])

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare conținute în prezentul apendice.

Apendicele 3a: concentrația inițială este 0,5 mg/l.

Apendicele 3b: concentrația inițială este 2 mg/l.

Apendicele 3c: concentrația inițială este 10 mg/l.

Apendicele 3d: concentrația inițială este 20 mg/l.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

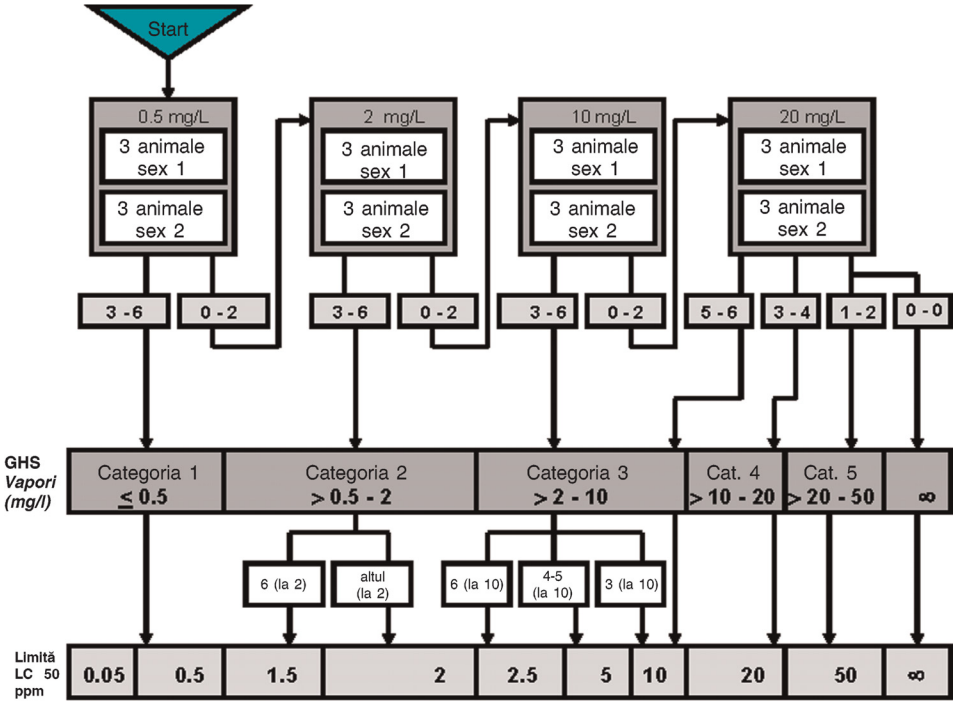
([1]) În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul Toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼M4

Apendicele 3a

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,5 mg/l/4h pentru vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

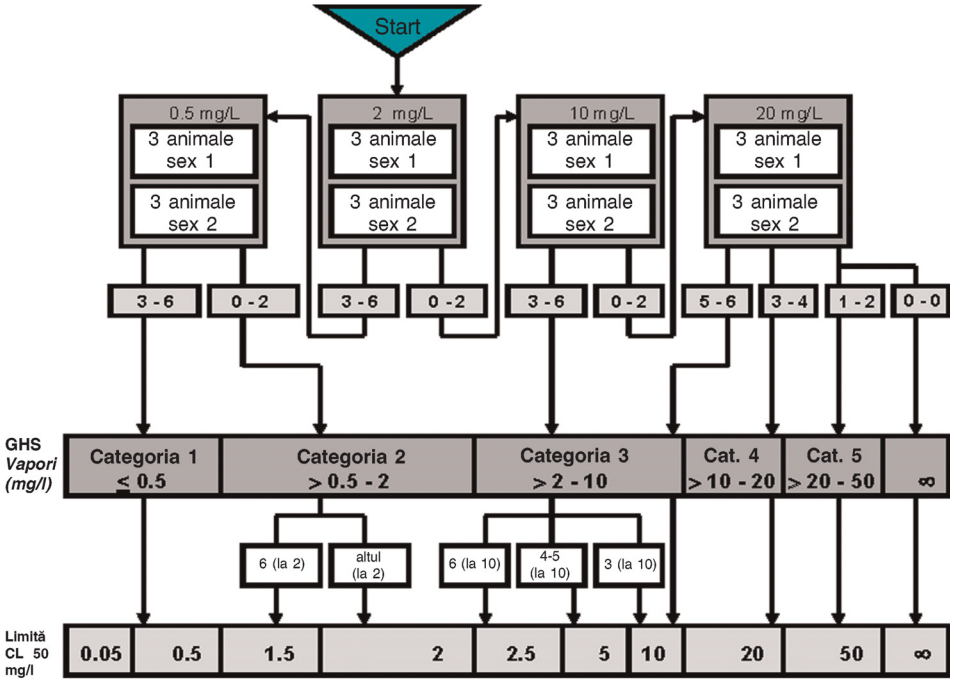
— Testare la 50 mg/l4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 3b

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 2 mg/l/4h pentru vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0–6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

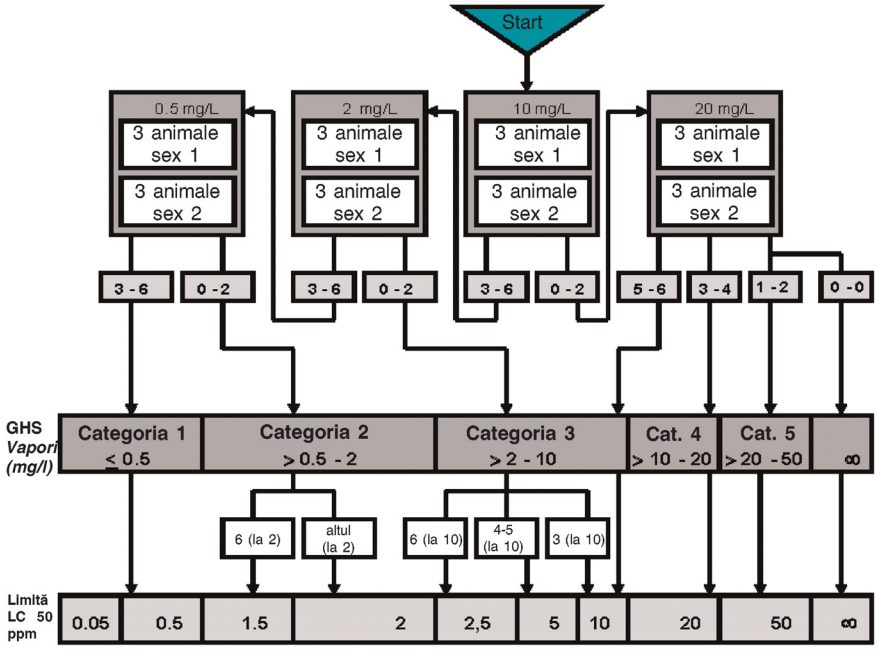
— Testare la 50 mg/l4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 3c

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 10 mg/l/4h pentru vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0–6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

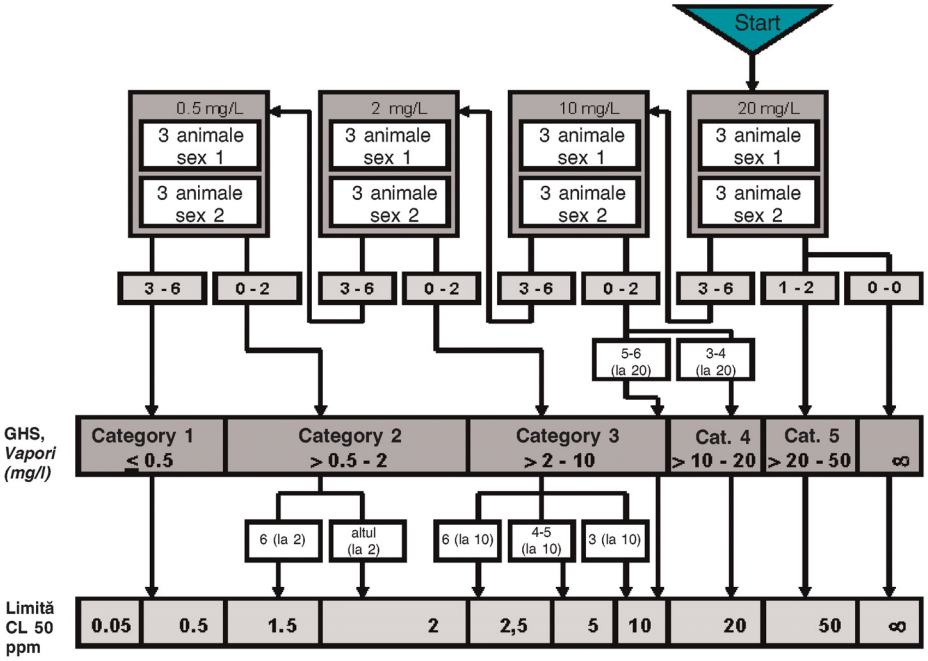
— Testare la 50 mg/l4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 3d

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 20 mg/l/4h pentru vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

— Testare la 50 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼**M4**

Apendicele 4

Procedura urmată pentru fiecare din concentrațiile inițiale pentru aerosoli (mg/L/4h)

Observații generale ([1])

Pentru fiecare concentrație inițială, ar trebui urmate diferitele scheme de testare conținute în prezentul apendice.

Apendicele 4a: concentrația inițială este 0,05 mg/l.

Apendicele 4b: concentrația inițială este 0,5 mg/l.

Apendicele 4c: concentrația inițială este 1 mg/l.

Apendicele 4d: concentrația inițială este 5 mg/l.

În funcție de numărul de animale moarte sau eutanasiate, procedura de testare de urmat este indicată prin săgeți.

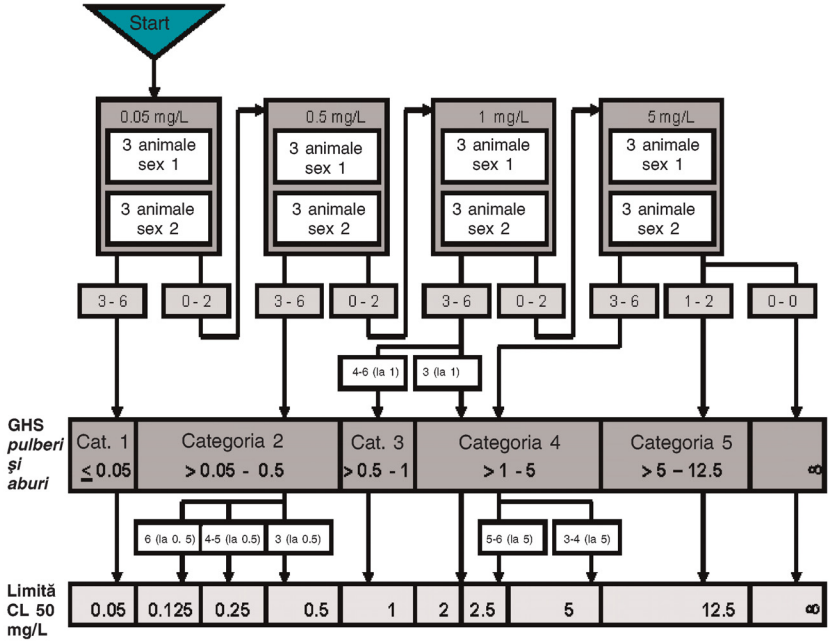
([1]) În următoarele tabele se face referire la GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). Echivalentul UE este Regulamentul (CE) nr. 1272/2008. În cazul toxicității acute prin inhalare, Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 (9) nu pune în aplicare Categoria 5.

▼M4

Apendicele 4a

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,05 mg/l/4h pentru vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul cel mai susceptibil sunt utilizate pe etapă

— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată

— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare

— ∞: neclasificat

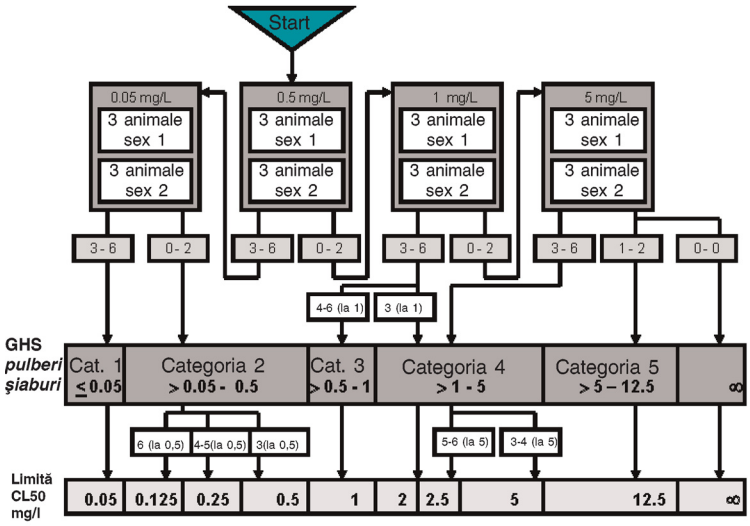
— Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 4b

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 0,5 mg/l/4h pentru aerosoli



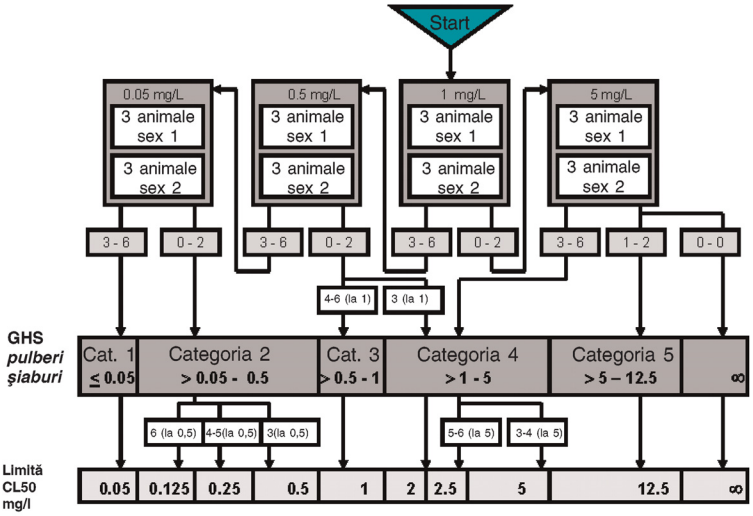
— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
— ∞: neclasificat
— Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 4c

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 1 mg 1/4h pentru aerosoil



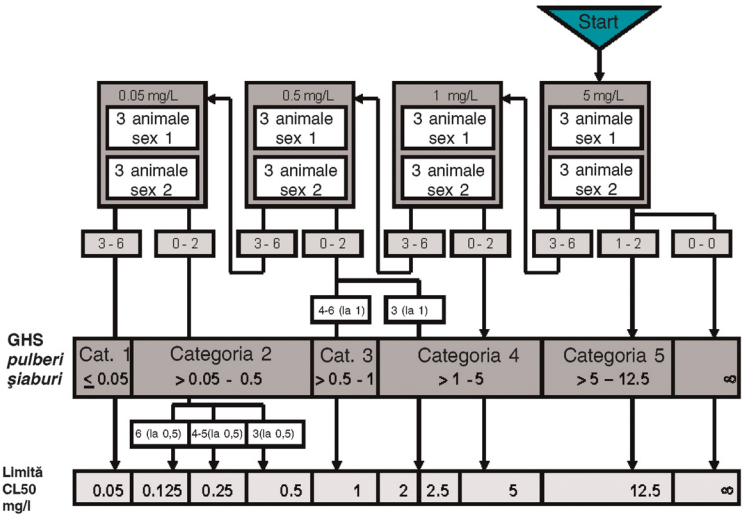
— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
— ∞: neclasificat
— Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)

▼M4

Apendicele 4d

Toxicitate acută prin inhalare

Procedură de testare cu o concentrație inițială de 5 mg/l/4h pentru aerosoli



— 3 ♂ + 3 ♀, sau 6 animale din sexul mai susceptibil sunt utilizate pe etapă
— 0-6: Numărul de animale muribunde sau moarte/concentrație testată
— GHS: Sistemul armonizat global de clasificare
— ∞: neclasificat
— Testare la 12,5 mg/l/4h: a se vedea documentul de orientare 39 (8)”

▼M5

B.53. STUDIU DE NEUROTOXICITATE ASUPRA DEZVOLTĂRII

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 426 privind testarea (2007). În iunie 1995, la Copenhaga, un grup de lucru al OCDE privind toxicitatea pentru reproducere și dezvoltare a discutat despre necesitatea actualizării orientărilor OCDE existente privind testarea toxicității pentru reproducere și dezvoltare și despre elaborarea de noi orientări pentru obiectivele care nu sunt încă reglementate (1). Grupul de lucru a recomandat elaborarea unor orientări privind testarea în domeniul neurotoxicității pentru dezvoltare pe baza unei orientări US EPA, care a fost ulterior revizuită (2). În iunie 1996, la Copenhaga a fost organizată o a doua reuniune de consultare pentru a oferi secretariatului îndrumare cu privire la elaborarea unor noi orientări privind testarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv elementele principale, de exemplu, detalii cu privire la alegerea speciilor de animale, perioada de dozare, perioada de testare, parametrii care trebuie să fie evaluați, precum și criteriile pentru evaluarea rezultatelor. În 1998 s-a publicat o orientare americană privind evaluarea riscurilor de neurotoxicitate (3). În octombrie 2000 au avut loc concomitent o reuniune consultativă a experților OCDE și un atelier al Institutului de științe privind riscurile al ILSI, iar în 2005 s-a organizat la Tokyo o reuniune consultativă a experților. Reuniunile au fost organizate pentru a discuta aspecte științifice și tehnice legate de actualele orientări privind testarea, iar recomandările formulate în urma reuniunilor (4) (5) (6) (7) au fost luate în considerare în elaborarea prezentei metode de testare. În documentele de orientare OCDE nr. 43 privind „Evaluarea și testele de toxicitate pentru reproducere” (8) și nr. 20 privind „Testele de neurotoxicitate” se pot consulta informații suplimentare cu privire la efectuarea, interpretarea și terminologia utilizată pentru prezenta metodă de testare (9).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

2. Există o serie de produse chimice despre care se știe că produc efecte neurotoxice pentru dezvoltare la oameni și la alte specii (10) (11) (12) (13). Pentru a analiza și a evalua caracteristicile toxice ale unui produs chimic, poate fi necesară determinarea potențialului de neurotoxicitate pentru dezvoltare. Studiile privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare sunt concepute pentru a oferi date, inclusiv caracterizări ale relației doză-răspuns, cu privire la potențialele efecte funcționale și morfologice asupra dezvoltării sistemului nervos al descendenților care ar putea rezulta din expunerea intrauterină și la începutul vieții.

3. Un studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare poate fi realizat ca studiu separat, poate fi încorporat într-un studiu privind toxicitatea asupra reproducerii și/sau neurotoxicitatea asupra adulților [de exemplu, metodele de testare B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)] sau poate fi adăugat la un studiu privind toxicitatea asupra dezvoltării prenatale [de exemplu, metoda de testare B.31 (17)]. În cazul în care un studiu privind neurotoxicitatea asupra dezvoltării este încorporat într-un alt studiu sau atașat la acesta, este necesar să se păstreze integritatea ambelor tipuri de studii. Toate testele trebuie să respecte legislația aplicabilă sau orientările guvernamentale și instituționale privind utilizarea animalelor de laborator în cercetare (de exemplu, 18).

4. Laboratorul de testare ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța de testat înainte de efectuarea studiului. Informațiile vor include identitatea și structura produsului chimic; proprietățile sale fizico-chimice; rezultatele oricăror alte teste de toxicitate *in vitro* sau *in vivo* efectuate pe substanța chimică în cauză; datele toxicologice privind substanțele chimice înrudite structural; și utilizarea (utilizările) anticipată (anticipate) ale substanței chimice. Astfel de informații sunt necesare pentru a dovedi tuturor celor interesați că testul este relevant pentru protecția sănătății oamenilor și vor contribui la selectarea unei doze inițiale adecvate.

▼M5

PRINCIPIUL TESTULUI

5. Substanța de testat se administrează animalelor în timpul gestației și alăptării. Femelele sunt testate pentru a evalua efectele la femelele gestante și în perioada lactației și pot, de asemenea, să ofere informații comparative (femele vs. pui). Puii sunt selectați aleatoriu dintre toți puii pentru evaluarea neurotoxicității. Evaluarea constă în observații pentru a detecta tulburările neurologice și de comportament globale, inclusiv evaluarea dezvoltării fizice, a ontogenezei comportamentului, a activității motorii, a funcției motorii și senzoriale și a învățării și memoriei; precum și evaluarea greutății și neuropatologiei creierului în timpul dezvoltării postnatale și la maturitate.

6. În cazul în care metoda de testare se aplică independent, animalele suplimentare disponibile din fiecare grup ar putea fi utilizate pentru anumite proceduri neurocomportamentale, neuropatologice, neurochimice sau electrofiziologice care să completeze datele obținute din examinările recomandate de prezenta metodă de testare (16) (19) (20) (21). Procedurile suplimentare pot fi deosebit de utile în cazurile în care observațiile empirice, efectele anticipate sau mecanismul/modul de acțiune sugerează un anumit tip de neurotoxicitate. Examinările suplimentare pot fi utilizate atât în cazul femelelor, cât și în cazul puilor. De asemenea, se pot utiliza proceduri *ex vivo* sau *in vitro*, atât timp cât astfel de proceduri nu modifică integritatea procedurilor *in vivo*.

PREGĂTIRI PENTRU TESTE

Selectarea speciei de animale

7. Specia preferată pentru test este șobolanul; alte specii pot fi utilizate atunci când este cazul. De reținut, cu toate acestea, că zilele de gestație și după fătare specificate în prezenta metodă de testare sunt proprii pentru speciile de șobolani utilizate în mod obișnuit, iar în cazul în care se utilizează o specie diferită sau o sușă neobișnuită, se selectează zile comparabile. Utilizarea unei alte specii trebuie justificată pe bază de date toxicologice, farmacocinetice și/sau alte date. Justificarea va include disponibilitatea unor evaluări postnatale neurocomportamentale și neuropatologice specifice speciei. Dacă a existat un test anterior care a pus probleme, trebuie să se țină cont de specia/sușa pentru care s-au exprimat preocupări. Date fiind atributele de performanță diferite ale diverselor sușe de șobolani, trebuie să existe dovezi că sușa selectată în vederea utilizării are un nivel adecvat de fertilitate și de capacitate de reacție. Trebuie să se documenteze fiabilitatea și sensibilitatea altor specii pentru a detecta neurotoxicitatea asupra dezvoltării.

Condiții de adăpostire și de hrănire

8. Se recomandă ca temperatura încăperii în care se află animalele utilizate pentru experimente să fie de 22 ± 3 °C. Deși se recomandă ca umiditatea relativă să fie de cel puțin 30 % și de preferat să nu depășească 70 %, exceptând operațiunile de curățare a sălii, ar trebui menținută o umiditate de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, alternând 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. De asemenea, este posibil să se inverseze ciclul de lumină înainte de împerechere și pe durata studiului, pentru efectuarea evaluărilor parametrilor funcționali și de comportament în timpul perioadei de întuneric (în condiții de lumină roșie), și anume, în perioada în care animalele sunt în mod normal active (22). Orice modificări ale ciclului lumină-întuneric trebuie să cuprindă o perioadă de aclimatizare pentru a permite animalelor să se adapteze la noul ciclu. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Se raportează tipul de alimente și de apă și ambele trebuie să fie analizate pentru contaminanți.

▼M5

9. Animalele pot fi adăpostite individual sau în cuști în grupuri mici de același sex. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. După constatarea copulației sau nu mai târziu de ziua 15 de gestație, animalele împerecheate se plasează în cuști speciale de fătare sau de maternitate. Cuștile se aranjează astfel încât posibilele efecte cauzate de amplasarea acestora să fie reduse la minimum. Femelelor împerecheate li se oferă materiale adecvate și determinate pentru construirea cuibului atunci când se apropie momentul fătării. Este bine cunoscut faptul că manipularea inadecvată și stresul în timpul sarcinii pot conduce la rezultate negative, inclusiv pierderi de sarcină și dezvoltare fetală și postnatală modificată. Pentru a evita pierderea fătului din cauza unor factori care nu sunt corelați cu tratamentul, animalele se manipulează cu grijă în timpul sarcinii și se evită stresul cauzat de factori externi, cum ar fi zgomotul exterior excesiv.

Pregătirea animalelor

10. Se utilizează animale sănătoase, care au fost aclimatizate la condițiile de laborator și care nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare, cu excepția cazului în care studiul este încorporat într-un alt studiu (a se vedea punctul 3). Animalele de experiență sunt descrise precizând specia, sușa, sursa, sexul, greutatea și vârsta. Fiecărui animal i se atribuie un număr de identificare unic, cu care este marcat. Se recomandă ca animalele din toate grupurile testate să aibă, pe cât posibil, greutăți și vârste apropiate și trebuie să se situeze în intervalul normal de specie și sușă aflate în studiu. La fiecare nivel al dozei se utilizează femele adulte tinere, nulipare. Nu se împerechează animale consangvine, o atenție deosebită trebuind acordată pentru a garanta acest lucru. Ziua 0 de gestație este ziua în care se observă un dop vaginal și/sau spermă. Atunci când se achiziționează animale gestante de la un furnizor, se acordă timp suficient pentru aclimatizare (de exemplu, 2-3 zile). Femelele se distribuie aleatoriu în grupurile martor și de tratament și, pe cât posibil, acestea ar trebui să fie distribuite uniform în toate grupurile (de exemplu, se recomandă o procedură aleatorie stratificată pentru a asigura o distribuție uniformă în toate grupurile, cum ar fi cea în funcție de greutatea corporală). Femelele inseminate de același mascul se distribuie în mod egal în toate grupurile.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

11. Fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de femele gestante care să fie expuse la produsul chimic testat pentru a se asigura că se produce un număr adecvat de descendenți pentru evaluarea neurotoxicității. Pentru fiecare nivel de doză se recomandă un total de 20 de cuiburi. Modelele de dozare duplicată și fragmentată de grup sunt permise în cazul în care se atinge numărul total de cuiburi pentru fiecare grup și se utilizează modele statistice adecvate pentru lua în considerare duplicatele.

12. În sau înainte de ziua 4 după fătare (*postnatal day,* PND) (ziua de fătare este PND 0), dimensiunea fiecărui cuib se ajustează eliminând surplusul de pui în mod aleatoriu pentru a obține o dimensiune uniformă a cuibului pentru toate cuiburile (23). Dimensiunea cuibului nu depășește mărimea medie a cuibului pentru sușa de rozătoare utilizate (8-12). Cuibul cuprinde, în cea mai mare măsură posibil, un număr egal de pui masculi și femele. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale, nu este adecvată. După standardizarea cuiburilor (sacrificare) și înainte de testarea în continuare a parametrilor funcționali, puii individuali care sunt programați pentru testare înainte de înțărcare sau după înțărcare trebuie să fie identificați în mod unic, utilizând orice metodă adecvată cu suferințe minime pentru identificarea puilor (de exemplu, 24).

▼M5

Repartizarea animalelor pentru teste funcționale și de comportament, greutăți ale creierului și evaluări neuropatologice

13. Metoda de testare permite abordări diferite cu privire la repartizarea animalelor expuse intrauterin și în perioada de alăptare pentru teste funcționale și de comportament, maturizare sexuală, determinarea greutății creierului și evaluare neuropatologică (25). Alte teste privind funcția neurocomportamentală (de exemplu, comportamentul social), neurochimia sau neuropatologia pot fi adăugate de la caz la caz, atât timp cât nu se compromite integritatea testelor necesare inițial.

14. Sunt selectați pui din fiecare grup tratat și sunt repartizați pentru evaluările obiectivelor în sau după PND 4. Selecția puilor se efectuează astfel încât, în măsura posibilului, ambele sexe din fiecare cuib din fiecare grup tratat să fie reprezentate în mod egal în toate testele. Pentru testarea activității motorii, aceeași pereche de pui masculi și femele se testează la fiecare vârstă înainte de înțărcare (a se vedea punctul 35). Pentru toate celelalte teste, aceeași pereche sau perechi separate de masculi și de femele pot fi repartizate pentru diferite teste de comportament. Ar putea fi necesar să se repartizeze pui diferiți pentru testele pe pui înțărcați vs. adulți ale funcției cognitive pentru a evita confuzia efectelor vârstei și ale dresajului prealabil asupra măsurătorilor (26) (27). La înțărcare (PND 21), puii care nu au fost selectați pentru testare pot fi eutanasiați. Se raportează orice modificări ale repartizării puilor. Unitatea statistică de măsură ar trebui să fie cuibul (sau femela), nu și puiul.

15. Există diferite modalități de repartizare a puilor pentru examinarea înainte de înțărcare și după înțărcare, teste cognitive, examene patologice etc. (a se vedea figura 1 pentru conceptul general și anexa 1 pentru exemple de repartizare). Numărul minim de animale recomandat în fiecare grup tratat și pentru examinările înainte de înțărcare și după înțărcare este după cum urmează:

Observații clinice și greutate corporală	Toate animalele
Observații clinice detaliate	20/sex (1/sex/cuib)
Greutatea creierului (după fixare) PND 11-22	10/sex (1/cuib)
Greutatea creierului (nefixat) ~ PND 70	10/sex (1/cuib)
Neuropatologie (fixare prin imersie sau perfuzare) PND 11-22	10/sex (1/cuib)
Neuropatologie (fixare prin perfuzare) ~ PND 70	10/sex (1/cuib)
Maturizare sexuală	20/sex (1/sex/cuib)
Alte repere de dezvoltare (opțional)	Toate animalele
Ontogeneza comportamentului	20/sex (1/sex/cuib)
Activitatea motorie	20/sex (1/sex/cuib)
Funcția motorie și senzorială	20/sex (1/sex/cuib)
Învățare și memorie	10/sex ([a]) (1/cuib)

([a]) În funcție de sensibilitatea testelor funcției cognitive, se ia în considerare investigarea unui număr mai mare de animale, de exemplu, până la 1 mascul și 1 femelă per cuib (pentru repartizarea animalelor, a se vedea anexa 1) [în Documentul de orientare OCDE nr. 43 se oferă orientări suplimentare privind dimensiunea eșantionului (8)].

▼M5

Dozare

16. Se utilizează cel puțin trei doze și un martor paralel. Nivelurile dozei sunt distanțate pentru a produce o gradare a efectelor toxice. Cu excepția cazului în care doza este limitată de natura fizico-chimică și biologică a substanței chimice, se alege cea mai ridicată doză cu scopul de a induce o oarecare toxicitate maternă [de exemplu, semne clinice, încetinirea creșterii în greutate (nu mai mult de 10 %) și/sau dovezi de toxicitate de limitare a dozei într-un organ țintă]. Doza ridicată poate fi limitată la 1 000 mg/kg greutate corporală/zi, cu unele excepții. De exemplu, expunerea umană așteptată ar putea indica necesitatea utilizării unei doze mai ridicate. Alternativ, se efectuează studii pilot sau studii preliminare de stabilire a dozei pentru a determina cea mai ridicată doză de utilizat, care să producă un grad minim de toxicitate maternă. Dacă substanța de testat s-a dovedit a fi toxică pentru dezvoltare, fie într-un studiu standard de toxicitate asupra dezvoltării, fie într-un studiu pilot, cea mai ridicată doză ar trebui să fie doza maximă care nu va induce toxicitate excesivă la urmași sau deces intrauterin sau neonatal sau malformații, suficientă pentru a exclude o evaluare semnificativă a neurotoxicității. Doza cea mai mică nu trebuie să producă niciun efect toxic asupra mamei sau asupra dezvoltării, inclusiv neurotoxicitate. Se selectează o serie descrescătoare de doze, în scopul de a demonstra o eventuală relație doză-efect și nivelul dozei fără efecte adverse vizibile (NOAEL) sau doze aproape de limita de detecție care ar permite stabilirea unei doze de referință. În mod frecvent, pentru stabilirea seriei descrescătoare a dozelor, intervalul optim este un factor de 2 sau 4 și deseori este preferabil să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.

17. Pentru selectarea nivelurilor dozelor se ține seama de toate datele existente privind toxicitatea, precum și de informațiile suplimentare privind metabolismul și toxicocinetica substanței de testat sau a materialelor cu o structură analogă. Informațiile respective se utilizează, de asemenea, pentru a demonstra caracterul adecvat al regimului de dozare. Ar trebui să se ia în considerare dozarea directă a puilor pe baza expunerii și a informațiilor farmacocinetice (28) (29). Înainte de a efectua studii de dozare directă, se realizează o examinare atentă a avantajelor și a dezavantajelor (30).

18. Grupul martor paralel este un grup martor supus unui tratament simulat sau unui tratament exclusiv cu vehicul, în cazul în care pentru administrarea substanței chimice testate se utilizează un vehicul. În mod normal, tuturor animalelor li se administrează același volum de substanță testată sau de vehicul în funcție de greutatea corporală. Dacă se folosește un vehicul sau un alt aditiv pentru a facilita administrarea dozei, se iau în considerare următoarele caracteristici: efectele asupra absorbției, circulației, metabolizării sau retenției substanței testate; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței chimice testate care pot să altereze caracteristicile sale toxice, precum și efectele asupra consumul de hrană sau apă ori asupra stării de nutriție a animalelor. Vehiculul nu ar trebui să producă efecte care ar putea să interfereze cu interpretarea studiului și trebuie să nu fie toxic din punct de vedere neurocomportamental și să nu aibă efecte asupra reproducerii sau dezvoltării. Pentru substanțele noi utilizate ca vehicul, trebuie să se includă un grup martor supus unui tratament simulat în plus față de un grup martor pentru vehicul. Animalele din grupul/grupurile martor se manipulează la fel cu animalele din grupul tratat.

▼M5

Administrarea dozelor

19. Substanța chimică testată sau vehiculul se administrează pe calea cea mai relevantă pentru expunerea umană potențială și pe baza informațiilor privind metabolizarea și circulația la animalele de experiență. Calea de administrare va fi, în general, orală (de exemplu, gavaj, prin alimentație, în apa de băut), dar pot fi utilizate și alte căi (de exemplu, inhalare) în funcție de caracteristicile și de căile de expunere cunoscute sau anticipate la om [precizări suplimentare sunt furnizate în documentul de orientare nr. 43 (8)]. Trebuie să se ofere o justificare pentru calea de administrare aleasă. Substanța chimică testată se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi.

20. Doza administrată fiecărui animal se calculează în mod normal în funcție de greutatea corporală individuală la cea mai recentă cântărire. Cu toate acestea, în ultimul trimestru al gestației, doza se calculează cu prudență. Dacă se observă o toxicitate excesivă la mame, animalele în cauză sunt eutanasiate.

21. Substanța chimică testată sau vehiculul se administrează, ca un minim, zilnic la femelele care s-au împerecheat din momentul implantării (ziua 6 de gestație) pe parcursul alăptării (PND 21), astfel încât puii să fie expuși la substanța testată în timpul dezvoltării neurologice prenatale și postnatale. Vârsta la care începe tratamentul, precum și durata și frecvența administrării pot fi adaptate în cazul în care dovezile sprijină un concept experimental mai relevant pentru expunerile umane. Duratele de dozare se adaptează pentru alte specii cu scopul de a asigura expunerea în timpul tuturor stadiilor timpurii de dezvoltare a creierului (și anume, echivalentul dezvoltării prenatale și postnatale timpurii a creierului uman). Tratamentul poate începe de la inițierea gestației (ziua 0 de gestație), deși ar trebui să se țină seama de eventualitatea ca substanța chimică de testat să provoace pierdere în faza de preimplantare. Administrarea care pornește din ziua 6 de gestație ar evita acest risc, dar nu ar fi tratate etapele de dezvoltare între ziua 0 și ziua 6 de gestație. Atunci când un laborator achiziționează animale împerecheate anterior, nu este posibil să se înceapă administrarea dozelor în ziua 0 de gestație, prin urmare, ziua 6 de gestație ar fi o zi adecvată de pornire. Laboratorul de testare stabilește regimul de dozare în funcție de informațiile relevante cu privire la efectele substanței chimice de testat, experiența prealabilă și considerentele logistice; acesta poate include prelungirea administrării dincolo de întărcare. Tratamentul nu se va administra la data fătării în cazul animalelor care nu au încheiat fătarea puilor. În general, se presupune că expunerea puilor va avea loc prin laptele matern; cu toate acestea, în cazurile în care există o lipsă a dovezilor de expunere continuă la pui, trebuie să se ia în considerare dozarea directă a puilor. Dovezile de expunere continuă pot fi obținute, de exemplu, din informațiile farmacocinetice, toxicitatea la nivelul puilor sau modificările la nivelul biomarkerilor (28).

OBSERVAȚII

Observații privind femelele

22. Toate femelele se observă cu atenție cel puțin o dată pe zi în ceea ce privește starea de sănătate a acestora, inclusiv pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.

23. În timpul perioadelor de tratament și de observație, se efectuează în mod periodic observații clinice mai detaliate (cel puțin de două ori pe parcursul perioadei de administrare în timpul gestației și de două ori în timpul perioadei de administrare în timpul alăptării) utilizând cel puțin zece femele pentru fiecare nivel de doză. Animalele se observă în afara cuștii de către tehnicieni calificați care nu sunt informați cu privire la tratamentul administrat animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a reduce stresul animalelor, pentru a asigura un nivel maxim de imparțialitate din partea observatorului și pentru a maximiza fiabilitatea datelor provenite de la observatori diferiți. În cazul în care este posibil, se recomandă ca observațiile dintr-un anumit studiu să fie făcute de același tehnician.

▼M5

24. Prezența semnelor observate se consemnează. Ori de câte ori este posibil, se consemnează, de asemenea, magnitudinea semnelor observate. Observațiile clinice vizează, dar nu se limitează la, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimare, erecție piloasă, dimensiunea pupilei, respirație anormală și/sau respirație pe gură și orice semne neobișnuite de urinare sau defecație).

25. Se consemnează, de asemenea, toate reacțiile neobișnuite legate de poziția corpului, nivelul de activitate (de exemplu, explorarea mai intensă sau mai redusă a zonei standard) și coordonarea mișcărilor. Se înregistrează, de asemenea, modificările mersului (de exemplu, mers legănat, ataxie), modificările posturii corpului (de exemplu, cocoașe) și reacțiile la manipulare, la locul în care se află și la alți stimuli din mediu, precum și prezența unor mișcări clonice sau tonice, a convulsiilor sau a tremorului, comportamente stereotipe (de exemplu, curățarea excesivă, mișcări neobișnuite ale capului, mișcări circulare repetate), precum și comportamentele bizare (de exemplu, mușcături sau lins excesiv, automutilare, mers înapoi, emiterea de sunete) sau agresivitatea.

26. Se notează semnele de toxicitate, inclusiv data apariției, momentul zilei, gradul și durata.

27. Animalele se cântăresc la momentul administrării cel puțin săptămânal pe parcursul studiului, la data sau aproape de data administrării, precum și la PND 21 (înțărcare). Pentru studiile efectuate prin gavaj, femelele trebuie cântărite cel puțin de două ori pe săptămână. Dozele se ajustează în mod corespunzător la momentul fiecărei determinări a greutății corporale. Consumul de hrană se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în timpul gestației și alăptării. Consumul de apă se măsoară cel puțin o dată pe săptămână în cazul în care expunerea se face prin intermediul apei.

Observații asupra puilor

28. Toți puii sunt observați cu atenție cel puțin zilnic pentru a consemna simptomele de toxicitate și pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.

29. În timpul perioadelor de tratament și de observație, se efectuează observații clinice mai detaliate a puilor. Puii (cel puțin un pui/sex/cuib) sunt observați de către tehnicieni calificați care nu sunt informați cu privire la tratamentul administrat animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a asigura un nivel maxim de imparțialitate și pentru a maximiza fiabilitatea datelor obținute de observatori diferiți. În cazul în care este posibil, se recomandă ca observațiile dintr-un anumit studiu să fie făcute de același tehnician. Trebuie să se monitorizeze cel puțin caracteristicile descrise la punctele 24 și 25, după cum este adecvat pentru etapa de dezvoltare observată.

30. Se notează toate simptomele de toxicitate la pui, inclusiv data apariției, momentul zilei, gradul și durata.

Repere fizice și de dezvoltare

31. Modificările la nivelul reperelor de dezvoltare înainte de înțărcare (de exemplu, desfășurarea pavilionului urechii, deschiderea ochilor, erupția incisivilor) sunt corelate în mare măsură cu greutatea corporală (30) (31). Greutatea corporală poate fi cel mai bun indicator de dezvoltare fizică. Prin urmare, se recomandă măsurarea reperelor de dezvoltare doar în cazul în care există dovezi prealabile care atestă că respectivele criterii de evaluare vor furniza informații suplimentare. Calendarul pentru evaluarea parametrilor este indicat în tabelul 1. În funcție de efectele anticipate, precum și de rezultatele măsurătorilor inițiale, ar putea fi recomandabil să se adauge intervale de timp suplimentare sau să se efectueze măsurătorile în alte etape de dezvoltare.

▼M5

32. Atunci când se evaluează dezvoltarea fizică, este recomandabil să se utilizeze vârsta postcoitală, în loc de vârsta postnatală (33). Dacă puii sunt testați în ziua de înțărcare, se recomandă ca testarea să fie efectuată înainte de înțărcarea efectivă pentru a evita un efect de confuzie provocat de stresul asociat înțărcării. În plus, trebuie să se asigure că orice testare a puilor după înțărcare nu are loc în cele două zile după înțărcare.

Tabelul 1

Calendarul evaluării reperelor fizice și de dezvoltare, precum și a criteriilor de evaluare funcțională/comportamentală ([a])

Perioade de vârstă / Criterii de evaluare	Înainte de înțărcare ([b])	Adolescență ([b])	Adulți tineri ([b])
Repere fizice și de dezvoltare			
Greutatea corporală și observații clinice	Săptămânal ([c])	cel puțin o dată la două săptămâni	cel puțin o dată la două săptămâni
Greutatea creierului	PND 22 ([d])		la sacrificare
Neuropatologia	PND 22 ([d])		la sacrificare
Maturizarea sexuală	—	după caz	—
Alte repere de dezvoltare ([e])	după caz	—	—
Criteriile de evaluare funcțională/comportamentală			
Ontogeneza comportamentului	Cel puțin două măsurători		
Activitatea motorie (inclusiv de acomodare)	1-3 ori ([f])	—	o singură dată
Funcțiile motorie și senzorială	—	o singură dată	o singură dată
Învățare și memorie	—	o singură dată	o singură dată

([a]) Tabelul prezintă numărul minim de repetări ale măsurătorilor. În funcție de efectele anticipate, precum și de rezultatele măsurătorilor inițiale, ar putea fi recomandabil să se adauge intervale de timp suplimentare (de exemplu, animalele în vârstă) sau să se efectueze măsurătorile în alte stadii de dezvoltare.
([b]) Se recomandă ca puii să nu fie testați în cele două zile după înțărcare (a se vedea punctul 32). Vârstele recomandate pentru testarea adolescenților sunt: învățare și memorie = PND 25 ± 2; funcțiile motorie și senzorială = PND 25 ± 2. Vârstele recomandate pentru testarea adulților tineri sunt PND 60-70.
([c]) Greutățile corporale se măsoară cel puțin de două ori pe săptămână în cazul administrării directe a tratamentului pentru adaptarea dozelor într-un moment de creștere rapidă în greutate a corpului.
([d]) Greutățile creierului și neuropatologia pot fi evaluate mai devreme (de exemplu, PND 11), dacă este cazul (a se vedea punctul 39).
([e]) Atunci când este cazul, se notează și alte repere de dezvoltare pe lângă greutatea corporală (de exemplu, deschiderea ochilor) (a se vedea punctul 31).
([f]) A se vedea punctul 35.

33. Se numără și se stabilește sexul puilor vii, de exemplu, prin inspecție vizuală sau prin măsurarea distanței ano-genitale (34) (35), iar fiecare pui dintr-un cuib se cântărește individual, la fătare sau imediat după aceea, cel puțin săptămânal pe parcursul alăptării și, ulterior, cel puțin o dată la fiecare două săptămâni. Atunci când se evaluează maturitatea sexuală, se determină vârsta și greutatea corporală a animalului la momentul în care are loc permeabilitatea vaginală (36) și separarea prepuțială (37) cel puțin la un mascul și o femelă per cuib.

▼M5

Ontogeneza comportamentului

34. Ontogeneza anumitor comportamente se măsoară la cel puțin un pui/sex/cuib pe parcursul perioadei de vârstă corespunzătoare, aceiași pui fiind utilizați în toate zilele de testare pentru toate comportamentele evaluate. Zilele de măsurare trebuie să fie distanțate pe parcursul perioadei, pentru a defini modificarea, normală sau corelată cu tratamentul, a ontogenezei comportamentului respectiv (38). Următoarele sunt câteva exemple de comportamente a căror ontogeneză ar putea fi evaluată: reflexul de redresare, geotaxia negativă și activitatea motorie (38) (39) (40).

Activitatea motorie

35. Activitatea motorie se monitorizează (41) (42) (43) (44) (45) în cursul perioadelor dinainte de înțărcare și la vârsta adultă. Pentru testare la momentul înțărcării, a se vedea punctul 32. Sesiunea de testare trebuie să fie suficient de lungă pentru a demonstra acomodarea intrasesiune pentru grupul martor netratat. Se recomandă utilizarea activității motorii pentru a evalua ontogeneza comportamentului. În cazul în care se utilizează ca test al ontogenezei comportamentului, atunci testarea trebuie să utilizeze aceleași animale, pentru toate sesiunile de testare înainte de înțărcare. Testarea trebuie să fie suficient de frecventă pentru a evalua ontogeneza acomodării intrasesiune (44). Acest lucru poate necesita trei sau mai multe perioade de timp înainte de și, inclusiv, în ziua de înțărcare (de exemplu, PND 13, 17, 21). Testarea aceloraşi animale sau pui din același cuib trebuie să aibă loc, de asemenea, la o vârstă adultă aproape de sacrificare (de exemplu, PND 60-70). După caz, se poate efectua testare în zile suplimentare. Activitatea motorie se monitorizează prin intermediul unui dispozitiv automat de înregistrare a activității care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității (de exemplu, activitatea bazală măsurată de dispozitiv nu trebuie să fie atât de scăzută, încât să împiedice detectarea reducerii, nici atât de mare, încât să împiedice detectarea intensificării activității). Fiecare dispozitiv trebuie să fie testat prin metode standard pentru a se asigura, în măsura în care este posibil, fiabilitatea funcționării tuturor dispozitivelor și în toate zilele. În măsura în care este posibil, grupurile de tratament se distribuie în mod echilibrat pe toate dispozitivele. Fiecare animal trebuie să fie testat în mod individual. Grupurile de tratament trebuie să fie compensate în toate intervalele de testare pentru a evita interpretări eronate provocate de ritmul circadian de activitate. Ar trebui depuse eforturi pentru a garanta că variațiile condițiilor de testare sunt minime și că acestea nu sunt legate în mod sistematic de tratament. Printre variabilele care pot afecta numeroase măsurători ale comportamentului, inclusiv activitatea motorie, se numără nivelul de zgomot, dimensiunea și forma cuștii experimentale, temperatura, umiditatea relativă, condițiile de lumină, mirosurile, utilizarea cuștii sau a unei noi cuști experimentale și distragerile de mediu.

Funcțiile motorie și senzorială

36. Funcțiile motorie și senzorială se examinează în detaliu cel puțin o dată în perioada de adolescent și o dată în perioada de adult tânăr (de exemplu, PND 60-70). Pentru testarea la momentul înțărcării, a se vedea punctul 32. Trebuie să se realizeze o testare suficientă pentru a asigura o eșantionare cantitativă adecvată de modalități senzoriale (de exemplu, somato-senzoriale, vestibulare) și funcții motorii (de exemplu, forță, coordonare). Câteva exemple de teste ale funcțiilor motorii și senzoriale sunt răspunsul de împingere al extensorului (46), reflexul de redresare (47) (48), acomodarea reacției auditive (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54) și potențialele evocate (55).

▼M5

Teste de învățare și de memorie

37. Testul de învățare și de memorie asociativă trebuie să se desfășoare după înțărcare (de exemplu, 25 ± 2 zile) și pentru adulții tineri (PND 60 și mai mult). Pentru testarea la momentul înțărcării, a se vedea punctul 32. Pot fi utilizate același test sau teste separate în cele două etape de dezvoltare. Este permisă o anumită flexibilitate în selectarea testului (testelor) de învățare și de memorie în cazul șobolanilor înțărcați și adulți. Cu toate acestea, testul (testele) ar trebui să fie conceput(e) astfel încât să îndeplinească două criterii. În primul rând, învățarea se evaluează fie ca o modificare observată în timpul mai multor studii sau sesiuni repetate de învățare, fie prin intermediul unor teste care implică un singur studiu, cu referire la o condiție care verifică existența unor efecte neasociative ale experienței de învățare. În al doilea rând, testul (testele) trebuie să includă unele măsurători ale memoriei (pe termen scurt sau pe termen lung) în plus față învățarea inițială (achiziție), dar măsurarea memoriei nu poate fi raportată în absența unei măsurări a achiziției obținute prin intermediul aceluiași test. În cazul în care testul (testele) de învățare și de memorie arată un efect al substanței de testat, se pot lua în considerare teste suplimentare pentru a se exclude interpretările alternative bazate pe modificări ale capacităților senzoriale, motivaționale și/sau motorii. În plus față de cele două criterii de mai sus, se recomandă ca testul de învățare și de memorie să fie selectat pe baza sensibilității dovedite la clasa substanței chimice care face obiectul investigației, în cazul în care astfel de informații sunt disponibile în literatura de specialitate. În absența unor astfel de informații, exemplele de teste care pot fi efectuate pentru a îndeplini criteriile de mai sus includ: evitarea pasivă (43) (56) (57), potrivire-întârziată-la-poziție în cazul șobolanului adult (58) și în cazul șobolanului copil (59), condiționarea olfactivă (43) (60), labirintul de apă Morris (61) (62) (63), labirintul Biel sau Cincinnati (64) (65), labirintul brațului radial (66), labirintul-T (43), precum și achiziția și fixarea comportamentului controlat de program (26) (67) (68). În literatura de specialitate sunt descrise teste suplimentare pentru șobolanii înțărcați (26) (27) și șobolanii adulți (19) (20).

Examinarea post-mortem

38. Mamele pot fi eutanasiate după înțărcarea puilor.

39. Evaluarea neuropatologică a puilor se va efectua utilizând țesuturi de la animalele eutanasiate la PND 22 sau mai devreme, între PND 11 și PND 22, precum și la încheierea studiului. Pentru puii sacrificați până la PND 22, se evaluează țesuturile cerebrale; pentru animalele sacrificate la încheierea studiului, se evaluează atât țesuturile sistemului nervos central (SNC), cât și țesuturile sistemului nervos periferic (SNP). Animalele sacrificate la PND 22 sau mai devreme pot fi fixate prin imersiune sau perfuzare. Animalele sacrificate la încheierea studiului se fixează prin perfuzare. Toate aspectele legate de pregătirea probelor de țesut, de la perfuzarea animalelor la disecția probelor de țesuturi, prelucrarea țesuturilor și impregnarea lamelelor, utilizează un concept compensat, astfel că fiecare grup va conține eșantioane reprezentative din fiecare grup tratat. Orientări suplimentare privind neuropatologia pot fi consultate în documentul de orientare nr. 20 al OCDE (9), a se vedea, de asemenea, punctul 103.

Prelucrarea probelor de țesut

40. Se notează toate anomaliile macroscopice aparente la momentul autopsiei. Probele de țesut prelevate trebuie să reprezinte toate regiunile importante ale sistemului nervos. Probele de țesut prelevate se păstrează într-un fixator adecvat și se prelucrează în conformitate cu protocoalele histologice publicate standardizate (69) (70) (71) (103). Încorporarea în parafină este acceptabilă pentru țesuturi ale SNC și SNP, dar utilizarea osmiului în procedura de post-fixare, împreună cu încorporarea epoxi, ar putea fi adecvată atunci când este

▼M5

necesar un grad mai mare de rezoluție (de exemplu, pentru nervii periferici, atunci când se suspectează o neuropatie periferică și/sau pentru analiza morfometrică a nervilor periferici). Țesutul cerebral colectat pentru analiza morfometrică se încorporează în medii adecvate la toate nivelurile dozei în același timp pentru a evita contracția artefactelor care poate fi asociată cu depozitarea prelungită în fixator (6).

Examinarea neuropatologică

41. Obiectivele examinării calitative sunt:

(i) identificarea regiunilor din sistemul nervos care prezintă semne de modificări neuropatologice;

(ii) identificarea tipurilor de modificări neuropatologice rezultate din expunerea la substanța de testat; și

(iii) determinarea intervalului de severitate a modificărilor neuropatologice.

Secțiunile histologice reprezentative din eșantioanele de țesut se examinează la microscop de către un patolog instruit în mod corespunzător pentru a constata modificările neuropatologice. Pentru toate modificările neuropatologice se atribuie o notă subiectivă care indică severitatea. O colorație cu hematoxilină-eozină poate fi suficientă pentru evaluarea secțiunilor de creier de la animalele eutanasiate la PND 22 sau mai devreme. Cu toate acestea, pentru secțiunile de țesut de la nivelul SNC și SNP prelevate de la animalele sacrificate la încheierea studiului se recomandă o colorație cu mielină (de exemplu, luxol fast blue/violet de crezil) și colorație cu argint (de exemplu, colorațiile Bodian sau Bielschowsky). În funcție de aprecierea profesională a patologului și de tipul modificărilor observate, pot fi considerate adecvate alte metode de colorație pentru a identifica și a caracteriza anumite tipuri de modificări [de exemplu, proteină acidă fibrilară glială (GFAP) sau teste histochimice ale lectinei pentru a evalua modificările gliale și microgliale (72), fluoro-jad pentru a detecta necroza (73) (74) sau metode de impregnare cu argint specifice pentru degenerarea neuronală (75)].

42. Se efectuează evaluarea morfometrică (cantitativă), întrucât datele pot contribui la detectarea unor efecte corelate cu tratamentul și sunt importante pentru interpretarea diferențelor corelate cu tratamentul constatate în ceea ce privește greutatea sau morfologia creierului (76) (77). Țesuturile nervoase se eșantionează și se pregătesc pentru a permite evaluarea morfometrică. Evaluările morfometrice pot include, de exemplu, măsurători liniare sau zonale ale unor regiuni specifice ale creierului (78). Măsurătorile liniare sau zonale implică utilizarea de secțiuni omoloage atent selecționate pe baza unor repere microscopice fiabile (6). Stereologia poate fi utilizată pentru a identifica efecte corelate cu tratamentul asupra unor parametri cum ar fi volumul sau numărul de celule pentru anumite regiuni neuroanatomice (79) (80) (81) (82) (83) (84).

43. Se examinează creierul pentru a constata orice semne de modificări neuropatologice corelate cu tratamentul și, pentru a asigura o examinare aprofundată, se prelevează eșantioane adecvate din toate regiunile majore ale creierului (de exemplu, bulbii olfactivi, cortexul cerebral, hipocamp, ganglionii bazali, talamus, hipotalamus, mezencefal [*tectum*, *tegmentum* și pedunculii cerebrali), punte (lat. *pons*), bulb rahidian (lat. *medulla oblongata*), cerebel]. Este important ca la toate animalele secțiunile să fie prelevate în același plan. La adulții eutanasiați la încheierea studiului, se prelevează secțiuni reprezentative din măduva spinării și SNP. Zonele examinate trebuie să includă ochiul cu nervul optic și retina, măduva spinării la nodurile cervical și lombar, fibrele rădăcinii dorsale și ventrale, nervul sciatic proximal, nervul tibial proximal (la nivelul genunchiului) și ramurile nervului tibial al mușchiului gambei. Secțiunile din măduva spinării și din nervii periferici trebuie să includă secțiuni atât transversale, cât și longitudinale.

▼M5

44. Evaluarea neuropatologică trebuie să includă o examinare care vizează indicii de leziuni legate de dezvoltare la nivelul sistemului nervos (6) (85) (86) (87) (88) (89), în plus față de modificările celulare (de exemplu, vacuolizare neuronală, degenerare, necroză) și modificările tisulare (de exemplu, glioza, infiltrarea cu leucocite, formarea de chisturi). În acest sens, este important să se distingă între efectele corelate cu tratamentul și evenimentele de dezvoltare normală care au loc într-o etapă de dezvoltare care corespunde momentului eutanasierii (90). Exemple de modificări semnificative care indică defecte de dezvoltare includ, dar nu se limitează la:

— modificări ale dimensiunii sau ale formei macroscopice a bulbilor olfactivi, a creierului mare sau a cerebelului;

— modificări ale dimensiunii relative a diferitelor regiuni ale creierului, inclusiv scăderi sau creșteri ale dimensiunii regiunilor care rezultă din pierderea sau persistența unor populații de celule sau proiecții axonale care sunt în mod normal tranzitorii (de exemplu, stratul germinal extern al cerebelului, corpul calos);

— modificări la nivelul proliferării, al migrației și al diferențierii, astfel cum sunt acestea indicate de zone de apoptoză sau necroză excesivă, aglomerații sau populații dispersate de neuroni ectopici, dezorientați sau malformați sau modificări ale dimensiunii relative a diferitelor straturi de structuri corticale;

— modificări ale structurii de mielinizare, inclusiv o reducere generală a dimensiunii sau o colorație modificată a structurilor mielinizate;

— dovezi de hidrocefalie, în special extinderea ventriculelor, stenoza apeductului cerebral și subțierea emisferelor cerebrale.

Analiza relației doză-răspuns a modificărilor neurologice

45. Pentru analizele calitative și cantitative neuropatologice se recomandă următoarea procedură din punct de vedere al etapelor. În primul rând, secțiunile prelevate de la grupul tratat cu doza maximă sunt comparate cu cele ale grupului martor. În cazul în care nu se constată semne de modificări neurologice la animalele din grupul tratat cu doza maximă, nu este necesară o analiză suplimentară. În cazul în care se constată dovezi ale alterărilor neurologice la grupul tratat cu doza maximă, se examinează animalele din grupurile tratate cu dozele intermediare și, respectiv, doza cea mai scăzută. În cazul în care grupul tratat cu doza maximă este eliminat din cauza decesului sau a altor factorii asociați cu toxicitatea, se analizează modificările neurologice corespunzătoare dozei maxime și medii. În cazul în care există vreun indiciu de neurotoxicitate în grupurile tratate cu doze mai scăzute, se efectuează analiza neuropatologică a grupurilor respective. Dacă în examinările calitative sau cantitative se constată vreo modificare neurologică asociată tratamentului, se stabilește dependența de doză a incidenței, a frecvenței și a gradului de severitate a leziunilor sau a modificărilor morfometrice pe baza unei evaluări a tuturor animalelor din toate grupurile tratate. În evaluare trebuie să fie incluse toate regiunile creierului care prezintă vreo dovadă de modificare neuropatologică. Pentru fiecare tip de leziune, sunt descrise caracteristicile utilizate pentru definirea fiecărui grad de severitate, indicând caracteristicile utilizate pentru diferențierea fiecărui grad. Se notează frecvența fiecărui tip de leziune și nivelul de severitate a acesteia și se efectuează o analiză statistică pentru a evalua caracterul unei relații doză-răspuns. Se recomandă utilizarea unor lamele codificate (91).

DATE ȘI RAPORTARE

Data

46. Datele se raportează în mod individual și se sistematizează într-un tabel care indică, pentru fiecare grup de experiență, tipurile de schimbări și numărul de femele, puii în funcție de sex și cuiburile care prezintă fiecare tip de modificare. În cazul în care s-a efectuat expunerea postnatală directă a puilor, se raportează calea, durata și perioada de expunere.

▼M5

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

47. Un studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare va oferi informații cu privire la efectele expunerii repetate la o substanță chimică în timpul dezvoltării intrauterine și postnatale timpurii. Întrucât accentul este plasat atât pe efectele de toxicitate generală, cât și pe efectele de neurotoxicitate pentru dezvoltare, rezultatele studiului vor permite distingerea între efectele de neurodezvoltare care se produc în absența toxicității materne generale și cele care se manifestă doar la niveluri care sunt toxice, de asemenea, pentru femela gestantă. Din cauza relațiilor complexe de interdependență între conceptul studiului, analiza statistică și semnificația biologică a datelor, interpretarea adecvată a datelor privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare va implica expertiză (107) (109). Interpretarea rezultatelor testelor ar trebui să utilizeze o abordare bazată pe forța probantă a dovezilor (20) (92) (93) (94). Se discută modelele de comportament sau constatările morfologice, în cazul în care acestea sunt prezente, precum și dovezile vizând relația doză-efect. În caracterizare sunt incluse datele de la toate studiile relevante pentru evaluarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv studii epidemiologice umane sau rapoarte de caz și studii experimentale pe animale (de exemplu, date toxicocinetice, informații privind relația structură-activitate, date de la alte studii de toxicitate). Aceasta include relația dintre dozele de substanță de testat și prezența sau absența, incidența și amploarea oricăror efecte neurotoxice pentru fiecare sex (20) (95).

48. Evaluarea datelor trebuie să includă o analiză atât a semnificației biologice, cât și a celei statistice. Analiza statistică este considerată un instrument de orientare, mai degrabă decât de stabilire a interpretării datelor. Lipsa de semnificație statistică nu trebuie să fie singurul motiv pentru a conchide lipsa unui efect asociat tratamentului, la fel cum semnificația statistică nu trebuie să fie singura justificare pentru a constata prezența unui efect asociat tratamentului. Pentru a preîntâmpina eventuale constatări fals-negative și dificultățile inerente în a „dovedi un negativ”, se analizează datele pozitive disponibile și datele martor istorice, în special atunci când nu se observă efecte corelate cu tratamentul (102) (106). Se analizează probabilitatea unor rezultate fals-pozitive luând în considerare evaluarea statistică integrală a datelor (96). Evaluarea va include relația, dacă există, între modificările neuropatologice și comportamentale observate.

49. Toate rezultatele sunt analizate cu ajutorul unor modele statistice adecvate conceptului experimental (108). Alegerea unei analize parametrice sau neparametrice se justifică prin luarea în considerare a unor factori cum ar fi natura datelor (transformate sau nu) și distribuția acestora, precum și soliditatea relativă a analizei statistice selectate. Scopul și conceptul studiului ar trebui să ghideze alegerea analizelor statistice pentru a reduce la minimum erori de rezultate de tip I (fals pozitive) și de tip II (fals negative) (96) (97) (104) (105). Studiile de dezvoltare care utilizează specii multipare în cadrul cărora sunt testați mai mulți pui per cuib ar trebui să includă cuibul în modelul statistic pentru a evita creșterea ratelor de eroare de tip I (98) (99) (100) (101). Unitatea statistică de măsurare ar trebui să fie cuibul, și nu puiul. Experimentele trebuie concepute astfel încât ceilalți pui din cuib să nu fie tratați ca observații independente. Orice parametru măsurat în mod repetat pe același subiect trebuie analizat cu ajutorul unor modele statistice care determină lipsa caracterului independent al măsurătorilor.

Raport de testare

50. Raportul de testare va conține următoarele informații:

Produsul chimic de testat:

— natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare, inclusiv sursa;

▼M5

— puritatea preparatului și impuritățile cunoscute și/sau anticipate.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului, dacă acesta este altul decât apa sau serul fiziologic.

Animale de testare:

— speciile și sușa utilizată și o justificare dacă specia este alta decât șobolanul;

— furnizorul animalelor de testare;

— numărul, vârsta la începutul studiului și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar, apa etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

Condiții de testare:

— justificarea alegerii dozelor utilizate;

— justificarea căii de administrare și a perioadei de timp;

— specificații privind dozele administrate, inclusiv detalii cu privire la vehiculul, volumul și starea de agregare a substanței administrate;

— detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— metoda utilizată pentru identificarea unică a femelelor și a puilor;

— o descriere detaliată a procedurii/procedurilor de randomizare utilizată/utilizate pentru a repartiza femelele în grupurile de tratament, pentru a selecta puii pentru sacrificare și pentru a repartiza puii în grupurile testate;

— detalii cu privire la administrarea substanței de testat;

— conversia de la administrarea prin hrană/apă potabilă sau prin inhalare a concentrației substanței chimice de testare (ppm) în doză efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— condițiile de mediu;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei (de exemplu, apă de la robinet, apă distilată);

— datele de început și de încheiere a studiului.

Observații și proceduri de testare:

— o descriere detaliată a procedurilor utilizate pentru a standardiza observațiile și procedurile, precum și definițiile operaționale pentru punctarea observațiilor;

— o listă cu toate metodele de testare utilizate și justificarea utilizării acestora;

— detalii privind procedurile comportamentale/funcționale, patologice, neurochimice sau electrofiziologice utilizate, inclusiv informații și detalii privind dispozitivele automatizate;

— procedurile de calibrare și de garantare a echivalenței dispozitivelor și echilibrarea grupurilor de tratament în procedurile de testare;

— o scurtă justificare care să explice orice decizii care implică un raționament profesional.

▼M5

Rezultate (individuale și rezumatul acestora, inclusiv media și varianța, atunci când este cazul):

— numărul de animale la începutul studiului și numărul acestora la încheierea studiului;

— numărul de animale și de cuiburi utilizate pentru fiecare metodă de testare;

— numărul de identificare al fiecărui animal, precum și cuibul din care provine;

— mărimea cuibului și greutatea medie la fătare pe sexe;

— date privind greutatea corporală și modificarea greutății corporale, inclusiv greutatea corporală la deces pentru femele și pui;

— date privind consumul de alimente, precum și date privind consumul de apă, dacă este cazul (de exemplu, în cazul în care substanța chimică testată este administrată prin intermediul apei);

— date privind reacția toxică, în funcție de sex și de nivelul dozelor, inclusiv simptomele de toxicitate sau mortalitate, inclusiv ora și cauza decesului, dacă este cazul;

— natura, gravitatea, durata, data apariției, momentul din zi și evoluția observațiilor clinice detaliate;

— punctajul obținut pentru fiecare reper de dezvoltare (greutatea, maturizarea sexuală și ontogeneza comportamentului) la fiecare observare;

— o descriere detaliată a tuturor constatărilor comportamentale, funcționale, neuropatologice, neurochimice, electrofiziologice în funcție de sex, inclusiv creșteri și scăderi în raport cu grupurile martor;

— rezultatele autopsiei;

— greutatea creierului;

— orice diagnostice derivate din simptome și leziuni neurologice, inclusiv boli sau afecțiuni care apar în mod natural;

— imagini ale constatărilor exemplare;

— imagini cu putere redusă pentru a evalua omologia secțiunilor utilizate pentru morfometrie;

— date privind absorbția și metabolismul, inclusiv date suplimentare de la un studiu toxicocinetic separat, dacă sunt disponibile;

— tratarea statistică a rezultatelor, inclusiv modelele statistice utilizate pentru analizarea rezultatelor și rezultatele, indiferent dacă acestea au fost sau nu semnificative;

— lista personalului implicat în studiu, inclusiv formarea profesională.

Discutarea rezultatelor:

— informații privind relația doză-răspuns, în funcție de sex și de grup;

— legătura dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței chimice testate, în funcție de sex și de grup;

— impactul oricărei informații toxicocinetice asupra concluziilor;

— asemănările cu efectele oricăror substanțe neurotoxice cunoscute;

▼M5

— datele care susțin fiabilitatea și sensibilitatea metodei de testare (de exemplu, date pozitive și date martor istorice);

— relații, în cazul în care există, între efectele neuropatologice și funcționale;

— NOAEL sau doza de referință pentru femele și pui, în funcție de sex și de grup.

Concluzii:

— o discuție privind interpretarea generală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică de testat a cauzat sau nu neurotoxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponibil la: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponibil la: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Disponibil la: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Disponibil la: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Capitolul B.34 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra reproducerii la o generație.

(15) Capitolul B.35 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra reproducerii pe durata a două generații.

(16) Capitolul B.43 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate pe rozătoare.

(17) Capitolul B.31 din prezenta anexă, Studiu de toxicitate asupra dezvoltării prenatale.

(18) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals* (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Disponibil la: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Disponibil la: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437-445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338-341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129-135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056-1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A „best practices" approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

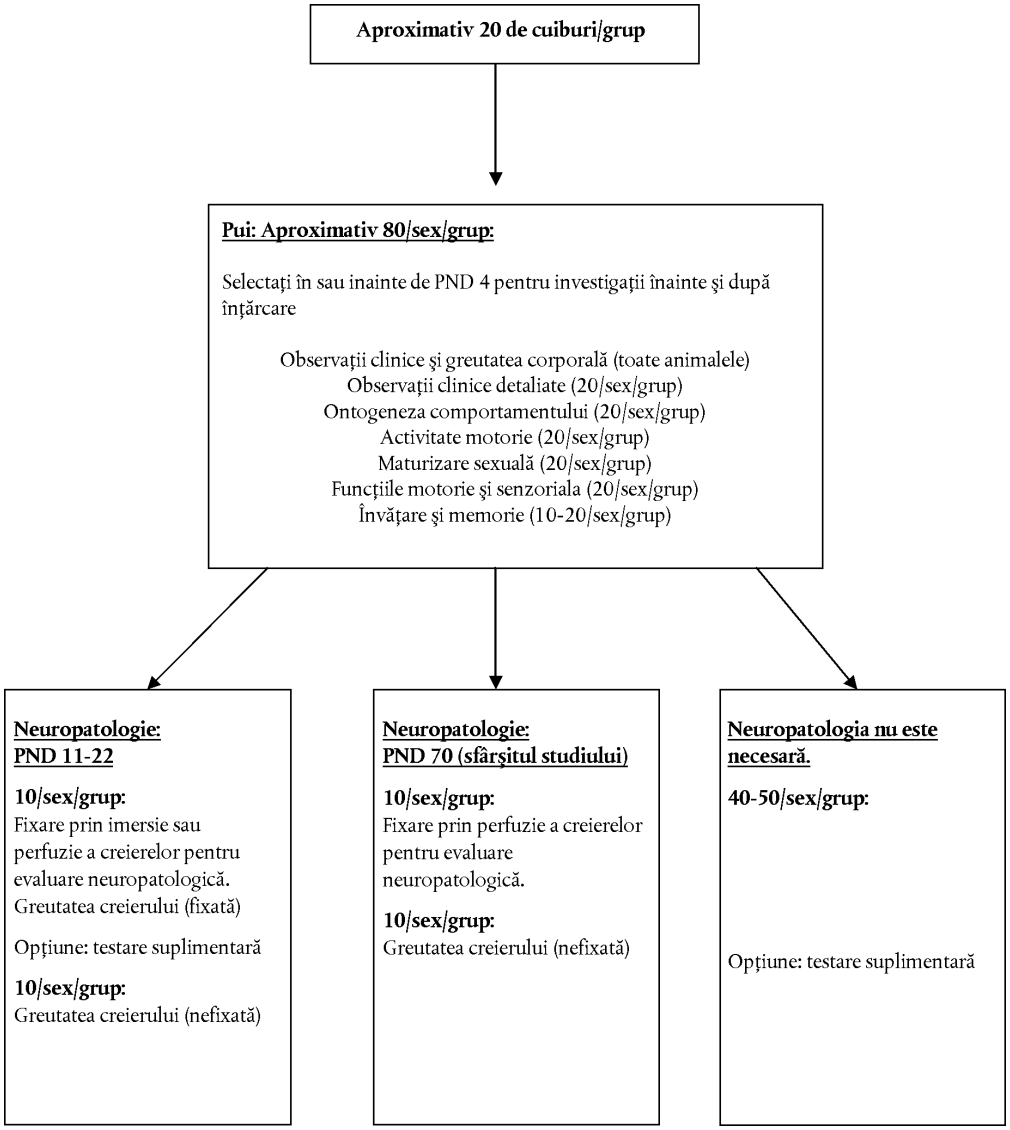
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼M5

Figura 1

Program general de testare pentru teste funcționale/comportamentale, evaluarea neuropatologiei, precum și greutățile creierului. Diagrama se bazează pe descrierea de la punctele 13-15 (PND = ziua după fătare). Exemple de repartizare a animalelor sunt prezentate în apendicele 1.



▼M5

Apendicele 1

1. Exemple de posibile distribuiri sunt descrise și tabelate mai jos. Exemplele sunt furnizate pentru a ilustra faptul că distribuirea animalelor de studiu în diferite modele de testare poate fi realizată în mai multe moduri diferite.

Exemplul 1

2. Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea înainte de înțărcare a ontogenezei comportamentului. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiate la PND 22. Creierele sunt îndepărtate, cântărite și prelucrate pentru evaluare histopatologică. De asemenea, sunt colectate date privind greutatea creierului utilizând creiere nefixate de la restul de 10 masculi și 10 femele pentru fiecare nivel de doză.

3. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru teste funcționale/comportamentale după înțărcare (observații clinice detaliate, activitate motorie, testarea reacției auditive și a funcției cognitive la adolescenți) și pentru evaluarea vârstei de maturizare sexuală. Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la încheierea studiului (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.

4. Pentru testarea funcției cognitive la adulții tineri (de exemplu, PND 60-70), se utilizează un al treilea set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib). Dintre animalele respective, 10 animale/sex/grup (1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt sacrificate la încheierea studiului, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.

5. Restul de 20 de animale/sex/grup sunt rezervate pentru eventuale teste suplimentare.

Tabelul 1

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogeneza comportamentului
		10 m + 10 f	PND 22 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului
		10 m + 10 f	PND 22 greutatea creierului
2	6	20 m + 20 f	Observații clinice detaliate
		20 m + 20 f	Activitatea motorie
		20 m + 20 f	Maturizarea sexuală
		20 m + 20 f	Funcțiile motorie și senzorială
		20 m + 20 f	Învățarea și memoria (PND 25)
		10 m + 10 f	Greutatea/neuropatologia/morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70

▼M5

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Învățarea și memoria (adulți tineri)
		10 m + 10 f	Greutatea creierului la adultul tânăr ~ PND 70
4	8	—	Animale de rezervă pentru înlocuiri și teste suplimentare

[a] Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.

Exemplul 2

6. Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea înainte de înțărcare a ontogenezei comportamentului. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiați la PND 11. Creierele sunt îndepărtate, cântărite și prelucrate pentru evaluare histopatologică.

7. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru examinări după înțărcare (observații clinice detaliate, activitate motorie, evaluarea vârstei de maturizare sexuală și a funcției motorii și senzoriale). Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la sacrificare (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.

8. Pentru testarea funcției cognitive la adolescenți și adulți tineri, se utilizează 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib). Pentru testarea funcției cognitive la PND 23 și la adulții tineri se utilizează animale diferite. La încheierea studiului, cele 10 animale/sex/grup testate ca adulți sunt sacrificate, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.

9. Restul de 20 de animale/sex/grup care nu au fost selectate pentru testare sunt sacrificate și eliminate la înțărcare.

Tabelul 2

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogeneza comportamentului
		10 m + 10 f	PND 11 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului
2	6	20 m + 20 f	Observații clinice detaliate
		20 m + 20 f	Activitatea motorie
		20 m + 20 f	Maturizarea sexuală
		20 m + 20 f	Funcțiile motorie și senzorială
		10 m + 10 f	Greutatea/neuropatologia/morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70

▼M5

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
3	7	10 m + 10 f [b]	Învățarea și memoria (PND 23)
3	7	10 m + 10 f [b]	Învățarea și memoria (adulți tineri) Greutatea creierului la adultul tânăr
4	8	—	Animale sacrificate și eliminate PND 21

[a] Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.
[b] Pentru teste cognitive la PND 23 și la adulții tineri se utilizează pui diferiți (de exemplu, cuiburi pare/impare din totalul de 20).

Exemplul 3

10. Un set de 20 de pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru cântărirea creierului și testarea neuropatologiei la PND 11. Dintre animalele respective, 10 pui/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt eutanasiați la PND 11, iar creierele sunt îndepărtate, cântărite și prelucrate pentru evaluare histopatologică. De asemenea, sunt colectate date privind greutatea creierului utilizând creiere nefixate de la restul de 10 masculi și 10 femele pentru fiecare nivel de doză.

11. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru testarea ontogenezei comportamentului (activitate motorie), examinări după înțărcare (activitate motorie și evaluarea vârstei de maturizare sexuală) și testarea funcției cognitive la adolescenți.

12. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) se utilizează pentru teste ale funcțiilor motorie și senzorială (testarea reacției auditive) și observații clinice detaliate. Dintre animalele respective, 10 animale/sex/nivel de doză (și anume, 1 mascul sau 1 femelă per cuib) sunt anesteziate și fixate prin perfuzie la încheierea studiului (aproximativ PND 70). După fixare suplimentară *in situ*, creierul este îndepărtat și prelucrat pentru evaluare neuropatologică.

13. Un alt set de 20 de animale/sex/nivel de doză se utilizează pentru testarea funcției cognitive la adulții tineri (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib). Dintre acestea, 10 animale/sex/grup (și anume, 1 mascul și 1 femelă per cuib) sunt sacrificate la încheierea studiului, iar creierul acestora se îndepărtează și se cântărește.

Tabelul 3

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
1	5	10 m + 10 f	PND 11 greutatea/neuropatologia/morfometria creierului
		10 m + 10 f	PND 11 greutatea creierului
2	6	20 m + 20 f	Ontogeneza comportamentului (activitatea motorie)
		20 m + 20 f	Activitatea motorie
		20 m + 20 f	Maturizarea sexuală
		20 m + 20 f	Învățarea și memoria (PND 27)

▼**M5**

Puiul nr. [a]		Nr. de pui alocați pentru test	Examinare/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Reacție auditivă (adolescenți și adulți tineri)
		20 m + 20 f	Observații clinice detaliate
		10 m + 10 f	Greutatea/neuropatologia/ morfometria creierului la adultul tânăr ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f	Învățarea și memoria (adulți tineri)
		10 m + 10 f	Greutatea creierului la adultul tânăr

[a] Pentru exemplul de față, cuiburile sunt reduse la 4 masculi + 4 femele; puii masculi sunt numerotați de la 1 la 4, iar puii femele, de la 5 la 8.

▼**M5**

Apendicele 2

Definiții

Substanță chimică: o substanță sau un amestec de substanțe.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec de substanțe testate utilizând prezenta metodă de testare.

▼M5

B.54. **BIOTESTUL UTEROTROFIC LA ROZĂTOARE: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI ESTROGENICE**

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 440 (2007). OCDE a inițiat în 1998 o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibililor perturbatori endocrini (1). Un element al activității a fost elaborarea de orientări privind testarea referitoare la biotestul uterotrofic la rozătoare. Ulterior, biotestul uterotrofic la rozătoare a fost supus unui amplu program de validare, inclusiv compilarea unui document de referință detaliat (2) (3) și desfășurarea de ample studii intra- și interlaboratoare pentru a demonstra relevanța și reproductibilitatea biotestului cu un estrogen de referință puternic, cu agoniști slabi ai receptorului de estrogen, cu un antagonist puternic al receptorului de estrogen, precum și cu o substanță chimică de referință (4) (5) (6) (7) (8) (9). Prezenta metodă de testare B.54 este rezultatul experienței dobândite în timpul programului de testare pentru validare și a rezultatelor astfel obținute cu agoniști cu efect estrogenic.

2. Biotestul uterotrofic este un test de depistare pe termen scurt care a început în anii 1930 (27) (28) și a fost standardizat mai întâi pentru depistare de către un comitet de experți în 1962 (32) (35). Acesta se bazează pe creșterea greutății uterine sau a răspunsului uterotrofic (pentru prezentare, a se vedea punctul 29). Testul evaluează capacitatea unei substanțe chimice de a obține activități biologice compatibile cu agoniști sau antagoniști estrogenici naturali (de exemplu, 17ß-estradiol); cu toate acestea, utilizarea sa pentru detectarea antagoniștilor este mult mai puțin frecventă decât pentru agoniști. Uterul răspunde la estrogeni în două moduri. Un răspuns inițial este o creștere în greutate datorată acumulării de apă. Acest răspuns este urmat de un câștig în greutate din cauza creșterii țesutului (30). Răspunsurile uterului la șobolani și la șoareci sunt comparabile din punct de vedere calitativ.

3. Biotestul uterotrofic servește ca test de depistare *in vivo* și aplicarea acestuia ar trebui să fie considerată în contextul „Cadrului conceptual OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini” (apendicele 2). În cadrul conceptual, biotestul uterotrofic este limitat la nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la un singur mecanism endocrin, și anume estrogenicitatea.

4. Biotestul uterotrofic este destinat să fie inclus într-o baterie de teste *in vitro* și *in vivo* pentru a identifica substanțele chimice cu potențial de a interacționa cu sistemul endocrin, conducând în cele din urmă la evaluări de risc pentru sănătatea umană sau pentru mediu. Programul de validare al OCDE a utilizat agoniști estrogenici atât puternici, cât și slabi pentru a evalua performanța testului pentru a identifica substanțe chimice cu efect estrogenic (4) (5) (6) (7) (8). Astfel, sensibilitatea procedurii de test pentru agoniștii estrogenici a fost bine demonstrată, pe lângă o bună reproductibilitate intra- și interlaboratoare.

5. În ceea ce privește substanțele chimice negative, doar o substanță chimică „negativă” de referință raportată deja negativ de testul uterotrofic, precum și de testele de receptori și testele *in vitro* de legare a receptorului a fost inclusă în programul de validare, însă date de testare suplimentare, care nu sunt legate de programul de validare al OCDE, au fost evaluate, sprijinind în continuare specificitatea biotestului uterotrofic pentru depistarea agoniștilor estrogenici (16).

▼**M5**

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

6. Agoniștii și antagoniștii estrogenici acționează ca liganzi pentru receptorii de estrogen a și b și pot activa sau, respectiv, inhiba acțiunea transcripțională a receptorilor. Aceasta poate avea potențialul de a conduce la pericole pentru sănătate, inclusiv efecte asupra reproducerii și dezvoltării. Prin urmare, există necesitatea de a evalua și a analiza rapid o substanță chimică ca un posibil agonist sau antagonist estrogenic. Deși informativă, afinitatea unui ligand pentru un receptor de estrogen sau activarea transcripției genelor reporter *in vitro* este doar unul dintre mai mulți factori determinanți de posibil pericol. Alți factori determinanți pot include activarea și dezactivarea metabolică la intrarea în corp, distribuția către țesuturile țintă și eliminarea din corp, depinzând, cel puțin în parte, de calea de administrare și de produsul chimic testat. Acest lucru conduce la necesitatea de a depista posibila activitate a unei substanțe chimice *in vivo*, în condiții corespunzătoare, cu excepția cazului în care caracteristicile substanței chimice referitoare la absorbție — distribuție — metabolism — eliminare (ADME) oferă deja informații adecvate. Țesuturile uterine răspund cu o creștere rapidă și energică la stimulare prin estrogeni, în special la rozătoarele de laborator, la care ciclul estral durează aproximativ 4 zile. Speciile de rozătoare, în special șobolanul, sunt utilizate, de asemenea, pe scară largă în studiile de toxicitate, în vederea caracterizării riscurilor. Prin urmare, uterul rozătoarelor este un organ țintă adecvat pentru depistarea *in vivo* a agoniștilor și antagoniștilor estrogenici.

7. Prezenta metodă de testare se bazează pe protocoalele utilizate în studiul de validare al OCDE, care s-au dovedit a fi fiabile și repetabile în studii intra- și interlaboratoare (5) (7). În prezent, sunt disponibile două metode, și anume, metoda femelelor adulte ovariectomizate (metoda adult-ovx) și metoda imaturelor neovariectomizate (metoda imatură). S-a demonstrat, în cadrul programului de teste de validare al OCDE, că ambele metode prezintă o sensibilitate și o reproductibilitate comparabile. Cu toate acestea, exemplarele imature, deoarece au un ax hipotalamo-pituitar-gonadal (HPG) intact, sunt oarecum mai puțin specifice, dar acoperă un domeniu de investigație mai extins decât animalele ovariectomizate, deoarece pot răspunde la substanțe chimice care interacționează cu axa HPG mai degrabă decât numai cu receptorul de estrogen. La șobolani, axa HPG este funcțională la aproximativ 15 zile. Înainte de această vârstă, pubertatea nu poate fi accelerată cu tratamente precum GnRH. Pe măsură ce femelele se apropie de pubertate, înainte de deschiderea vaginului, femela va avea mai multe cicluri silențioase care nu au drept rezultat deschiderea vaginului sau ovulația, dar există unele fluctuații hormonale. În cazul în care o substanță chimică stimulează axa HPG în mod direct sau indirect, rezultă pubertate precoce, ovulație timpurie și deschiderea accelerată a vaginului. Nu numai substanțele chimice care acționează asupra axei HPG au acest efect, ci și anumite tipuri de hrană cu niveluri mai ridicate de energie metabolizabilă decât altele stimulează creșterea și accelerează deschiderea vaginului, fără a fi substanțe cu efect estrogenic. Astfel de substanțe chimice nu ar determina un răspuns uterotrofic în animalele adulte OVX, deoarece axa HPG a acestora nu funcționează.

8. Din motive de bunăstare a animalelor, ar trebui să se acorde prioritate metodei care utilizează șobolani imaturi, evitând tratarea chirurgicală prealabilă a animalelor și o eventuală neutilizare a animalelor care dau semne că ar intra în ciclul estral (a se vedea punctul 30).

▼M5

9. Răspunsul uterotrofic nu este în întregime de origine estrogenică, însemnând că substanțe chimice altele decât agoniștii sau antagoniștii estrogenici pot, de asemenea, să provoace o reacție. De exemplu, doze relativ mari de progesteron, testosteron sau diferite tipuri sintetice de progestin pot conduce la o reacție stimulativă (30). Orice reacție poate fi analizată din punct de vedere histologic pentru cheratinizarea și cornificarea vaginului (30). Indiferent de originea posibilă a reacției, un rezultat pozitiv al unui biotest uterotrofic ar trebui, în mod normal, să inițieze acțiuni pentru clarificare suplimentară. Dovezi suplimentare de estrogenicitate ar putea proveni din teste *in vitro*, cum ar fi testele de legare ER și testele de activare transcripțională, sau din alte teste *in vivo*, precum testarea femelelor la pubertate.

10. Luând în considerare faptul că biotestul uterotrofic servește ca test de depistare *in vivo*, abordarea de validare adoptată a servit atât considerentelor de bunăstare a animalelor, cât și unei strategii de testare secvențială. În acest scop, efortul s-a concentrat asupra validării riguroase a reproductibilității și a sensibilității pentru estrogenicitate — principala preocupare pentru multe substanțe chimice, în timp ce puține eforturi au fost direcționate către componenta de antiestrogenicitate a testului. A fost testat doar un singur antiestrogen cu activitate puternică, având în vedere faptul că numărul de produse chimice cu un profil antiestrogenic clar (neacoperite de o anumită activitate estrogenică) este foarte limitat. Astfel, metoda de testare este dedicată protocolului estrogenic, în timp ce protocolul care descrie modul antagonist al testării este inclus într-un document de orientare (37). Reproductibilitatea și sensibilitatea testului pentru substanțele chimice cu activitate pur antiestrogenică vor fi definite mai clar ulterior, după ce procedura de testare este în funcțiune pentru o anumită perioadă de timp și sunt identificate mai multe substanțe chimice cu această modalitate de acțiune.

11. Este recunoscut faptul că toate procedurile bazate pe animale trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator; descrierile îngrijirii și ale tratamentului prezentate mai jos sunt standarde minime de performanță și sunt prevalate de reglementările locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (38). OCDE oferă orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor de laborator (25).

12. Precum în toate testele care utilizează animale vii, este esențial să se asigure că datele sunt într-adevăr necesare, înainte de începerea testului. De exemplu, datele pot fi necesare în următoarele două condiții:

— potențial ridicat de expunere (nivelul 1 al cadrului conceptual, apendicele 2) sau indicații pentru estrogenicitate (nivelul 2), pentru a investiga dacă efectele pot să apară *in vivo*;

— efecte care indică estrogenicitate în testele *in vivo* de nivelul 4 sau 5 susținând ipoteza că efectele au fost legate de un mecanism estrogenic care nu poate fi elucidat utilizând un test *in vitro*.

13. Definițiile utilizate în prezenta metodă de testare sunt prezentate în apendicele 1.

▼M5

PRINCIPIUL TESTULUI

14. Biotestul uterotrofic se bazează pentru sensibilitatea sa pe un sistem de testare pe animale la care axul hipotalamo-pituitar-ovarian nu este funcțional, ceea ce generează niveluri endogene scăzute de estrogen aflat în circulație. Acest fapt va asigura un nivel de referință scăzut al greutății uterului și o limită maximă de răspuns la estrogenii administrați. Două stări sensibile la estrogen în rândul rozătoarelor femele îndeplinesc această cerință:

(i) femele imature după înțărcare și înainte de pubertate; și

(ii) femele adulte tinere după ovariectomie cu suficient timp pentru ca țesuturile uterine să regreseze.

15. Substanța de testat se administrează zilnic, prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. Se administrează doze gradate de substanță de testat la un minim de două grupuri de tratament (a se vedea punctul 33 pentru orientare) de animale de experiență, utilizând un singur nivel de doză pe grup și o perioadă de administrare de trei zile consecutive pentru metoda imaturilor sau o perioadă de administrare minimă de trei zile consecutive pentru metoda adulți OVX. Animalele sunt supuse autopsiei la aproximativ 24 de ore după ultima administrare. Pentru agoniștii estrogenici, media greutății uterului la grupurile de animale tratate în raport cu grupul tratat cu vehicul este evaluată pentru o creștere semnificativă din punct de vedere statistic. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic a mediei greutății uterului la un grup de tratament indică un răspuns pozitiv la biotest.

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciilor de animale

16. Se pot utiliza sușe de rozătoare folosite în mod normal în laborator. De exemplu, în timpul validării s-au utilizat sușele de șobolani Sprague-Dawley și Wistar. Nu se utilizează sușe cu utere cunoscute sau suspectate a fi mai puțin receptive. Laboratorul trebuie să demonstreze sensibilitatea sușei utilizate, astfel cum se specifică la punctele 26 și 27.

17. Șobolanul și șoarecele au fost utilizați în mod obișnuit în biotestul uterotrofic încă din anii 1930. Studiile de validare ale OCDE au fost realizate numai cu șobolani, pe baza unei înțelegeri a faptului că este de așteptat ca ambele specii să fie echivalente și, prin urmare, o specie ar trebui să fie suficientă pentru validare la nivel mondial în vederea economisirii resurselor și a animalelor. Șobolanul este specia aleasă în majoritatea studiilor de toxicitate asupra reproducerii și dezvoltării. Luând în considerare faptul că există o vastă bază de date istorice pentru șoareci și, prin urmare, pentru a extinde sfera metodei biotestului uterotrofic la rozătoare la utilizarea șoarecilor ca specie de testare, s-a efectuat un studiu limitat de validare suplimentar la șoareci (16). S-a selectat o abordare comparativă cu un număr limitat de substanțe chimice de testat, laboratoare participante și fără testare prin eșantionare codificată, în conformitate cu intenția inițială de a economisi resurse și animale. Studiul de validare comparativ arată pentru biotestul uterotrofic la șoareci femele adulte tinere ovariectomizate că, din punct de vedere calitativ și cantitativ, datele obținute la șobolani și la șoareci corespund unele cu altele. Deși rezultatul biotestului uterotrofic poate fi preliminar unui studiu pe termen lung, acesta permite ca animale din aceeași sușă și din aceeași sursă să fie utilizate în ambele studii. Abordarea comparativă s-a limitat la șoareci OVX și raportul nu furnizează un set solid de date pentru a valida modelul imatur, prin urmare, modelul imatur la șoareci nu este considerat în domeniul de aplicare a prezentei metode de testare.

▼M5

18. În consecință, în anumite cazuri se pot utiliza șoareci în locul șobolanilor. Trebuie oferită o justificare pentru utilizarea acestei specii, pe baza unor criterii toxicologice, farmacocinetice și/sau de alt tip. Pentru șoareci, ar putea fi necesare modificări ale protocolului. De exemplu, consumul de hrană al șoarecilor în funcție de greutatea corporală este mai mare decât cel al șobolanilor și, prin urmare, conținutul de fitoestrogen din hrană ar trebui să fie mai mic pentru șoareci decât pentru șobolani (9) (20) (22).

Condiții de adăpostire și hrănire

19. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator. Descrierile îngrijirii și ale tratamentului sunt standarde minime și sunt prevalate de reglementări locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (38). În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (cu un interval aproximativ ± 3 °C). Se asigură o umiditate relativă cu valoarea minimă de 30 % și cu valoarea maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Obiectivul ar fi o umiditate relativă de 5060 %. Iluminatul trebuie să fie artificial. Alternanța zilnică a iluminatului trebuie să fie de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric.

20. Hrana de laborator și apa potabilă se furnizează *ad libitum*. Animalele adulte tinere pot fi adăpostite individual sau în cuști în grupuri de până la trei animale. Din cauza vârstei fragede a animalelor imature, se recomandă adăpostirea în grup social.

21. Se știe că nivelurile ridicate de fitoestrogeni în hrana de laborator au ca efect creșterea greutății uterului la rozătoare într-o măsură suficient de mare pentru a interfera cu biotestul uterotrofic (13) (14) (15). Nivelurile ridicate de fitoestrogeni și de energie metabolizabilă în tipurile de hrană de laborator pot conduce, de asemenea, la pubertate prematură, în cazul în care sunt utilizate animale imature. Prezența fitoestrogenilor rezultă, în principal, din includerea de produse din soia și lucernă în tipurile de hrană de laborator și s-a dovedit că concentrațiile de fitoestrogeni variază de la un lot la altul de hrană standard de laborator (23). Greutatea corporală este o variabilă importantă deoarece cantitatea de hrană consumată este legată de greutatea corporală. Prin urmare, nivelul real al dozei de fitoestrogen consumat din aceeași hrană poate varia în funcție de specie și de vârstă (9). Pentru șobolanii femele imature, consumul de hrană în funcție de greutatea corporală poate fi aproximativ dublu față de cel al femelelor adulte tinere ovariectomizate. Pentru șoarecii adulți tineri, consumul de hrană în funcție de greutatea corporală poate fi de aproximativ patru ori cel al femelelor șobolan adulte tinere ovariectomizate.

22. Cu toate acestea, rezultatele biotestului uterotrofic (9) (17) (18) (19) arată că anumite cantități limitate de fitoestrogeni alimentari sunt acceptabile și nu reduc sensibilitatea biotestului. Ca orientare, nivelurile alimentare ale fitoestrogenilor nu trebuie să depășească 350 µg de echivalente de genistein/gram de hrană de laborator pentru femelele imature de șobolani Sprague Dawley și Wistar (6) (9). Regimurile alimentare trebuie, de asemenea, să fie adecvate atunci când testarea are loc pe femele de șobolani ovariectomizate adulte tinere, întrucât consumul alimentar în funcție de greutatea corporală este mai mic la tinerii adulți decât la animalele imature. Dacă se utilizează șoareci ovariectomizați sau șobolani mai sensibili la fitoestrogen, se analizează reducerea proporțională a nivelurilor de fitoestrogen alimentar (20). De asemenea, diferențele între energia metabolică disponibilă din diferite regimuri alimentare pot conduce la schimbări temporale privind începerea pubertății (21) (22).

▼M5

23. Înainte de studiu, este necesară selecția atentă a unui regim alimentar fără un nivel ridicat de fitoestrogeni [pentru orientări, a se vedea (6) (9)] sau de energie metabolizabilă, care pot afecta rezultatele (15) (17) (19) (22) (36). Asigurarea respectării corespunzătoare a sistemului de testare utilizat de laborator, astfel cum este specificat la punctele 26 și 27, este o metodă importantă de îndeplinire a ambilor factori. Ca măsură de protecție, în conformitate cu bunele practici de laborator (BPL), se realizează prelevarea de probe reprezentative din fiecare lot de hrană administrată în timpul studiului pentru eventuala analiză a conținutului de fitoestrogen (de exemplu, în cazul unei greutăți uterine ridicate în raport cu datele istorice privind grupurile martor sau un răspuns inadecvat la estrogenul de referință, 17 alfa-etinilestradiol). Alicotele se analizează ca parte a studiului sau congelate la – 20 °C sau astfel încât să se împiedice descompunerea probei înainte de analiză.

24. Unele materiale de așternut pot conține substanțe cu efect estrogenic care apar în mod natural sau substanțe chimice cu efect antiestrogenic (de exemplu, se știe că știuletele de porumb afectează ciclicitatea șobolanilor și pare să aibă efect antiestrogenic). Materialele de așternut selectate trebuie să conțină un nivel minim de fitoestrogeni.

Pregătirea animalelor

25. Animalele de laborator fără semne de boală sau anormalități fizice se distribuie în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile se aranjează astfel încât să se reducă la minimum posibilele efecte datorate amplasării acestora. Animalele trebuie identificate individual. De preferință, animalele imature se plasează în cuști cu mame sau mame adoptive până la înțărcare în timpul aclimatizării. Perioada de aclimatizare înainte de începerea studiului ar trebui să fie de aproximativ 5 zile pentru animalele adulte tinere și pentru animalele imature livrate cu mame sau mame adoptive. În cazul în care animalele imature sunt obținute ca pui înțărcați fără mame, este posibil să fie necesară o perioadă de aclimatizare mai scurtă, întrucât administrarea trebuie să înceapă imediat după înțărcare (a se vedea punctul 29).

PROCEDURĂ

Verificarea competenței laboratorului

26. Pentru a verifica competența laboratorului, se pot utiliza două opțiuni diferite:

— verificarea periodică, pe baza unui studiu inițial de control pozitiv cu valori de referință (a se vedea punctul 27). Cel puțin o dată la 6 luni și de fiecare dată când are loc o modificare care poate influența performanța testării (de exemplu, o nouă formulare a regimului alimentar, modificări la nivelul personalului care efectuează disecțiile, schimbarea sușei sau a furnizorului de animale etc.), se verifică capacitatea de reacție a sistemului de testare (modelul animal) utilizând o doză corespunzătoare (pe baza studiului de martor pozitiv de referință descris la punctul 27) a unui estrogen de referință: 17a-etinilestradiol (CAS nr. 57-63-6) (EE);

— utilizarea de controale simultane, prin includerea unui grup căruia i se administrează o doză corespunzătoare de estrogen de referință în fiecare test.

În cazul în care sistemul nu reacționează astfel cum se preconizează, condițiile de experiență sunt examinate și modificate în consecință. Se recomandă ca doza de estrogen de referință care va fi utilizată în cadrul ambelor metode să fie aproximativ ED 70-80.

▼M5

27. **Studiul de martor pozitiv de referință** — Înainte ca un laborator să efectueze un studiu utilizând pentru prima dată prezenta metodă de testare, trebuie să se demonstreze competența laboratorului prin testarea reactivității modelului animal, stabilind răspunsul la o doză de estrogen de referință: 17a-etinilestradiol (CAS nr. 57-63-6) (EE) cu un număr minim de patru doze. Reacția legată de greutatea uterului se va compara cu datele istorice [a se vedea referința bibliografică (5)]. În cazul în care studiul de martor pozitiv de referință nu produce rezultatele anticipate, sunt examinate și modificate condițiile experimentale.

Numărul și starea animalelor

28. Fiecare grup tratat și fiecare grup martor trebuie să includă cel puțin 6 animale (atât pentru protocoalele metodei imature, cât și pentru metoda adult-OVX).

Vârsta animalelor imature

29. Pentru biotestul uterotrofic cu animale imature, se specifică ziua fătării. Administrarea trebuie să înceapă suficient de devreme pentru a se asigura că, la sfârșitul administrării substanței chimice de testat, nu a avut încă loc creșterea fiziologică a estrogenilor endogeni asociată cu pubertatea. Pe de altă parte, există dovezi că animalele foarte tinere pot fi mai puțin sensibile. Pentru definirea vârstei optime, fiecare laborator trebuie să ia în considerare propriile date generale privind maturarea.

De regulă, administrarea tratamentului la șobolani poate începe imediat după înțărcarea prematură în ziua 18 după fătare (ziua fătării fiind ziua 0 după fătare). La șobolani, este preferabil ca administrarea să se efectueze în ziua 21 după fătare, dar, în orice caz, înainte de ziua 25 după fătare, întrucât, după această vârstă, axul hipotalamo-pituitar-ovarian devine funcțional, iar nivelurile de estrogen endogen pot începe să crească, cu o creștere concomitentă a greutății de referință a uterului și o creștere a deviațiilor standard ale grupului (2) (3) (10) (11) (12).

Procedura pentru ovariectomie

30. Pentru femele ovariectomizate de șobolani și de șoareci (grupurile martor și de tratament), ovariectomia se efectuează între 6 și 8 săptămâni. Pentru șobolani, trebuie să existe un interval de minimum 14 de zile între ovariectomie și prima zi de administrare pentru a permite uterului să se retragă până la un nivel de referință stabil minim. Pentru șoareci, trebuie să treacă cel puțin 7 zile între ovariectomie și prima zi de administrare. Întrucât cantități mici de țesut ovarian sunt suficiente pentru a produce niveluri semnificative de estrogeni aflate în circulație (3), animalele sunt testate înainte de utilizare prin observarea celulelor epiteliale prelevate prin tamponare din vagin pe parcursul a cel puțin cinci zile consecutive (de exemplu, pentru șobolani, zilele 10-14 după ovariectomie). În cazul în care animalele manifestă semne că ar intra în ciclul estral, acestea nu sunt utilizate. De asemenea, în momentul autopsiei, se examinează resturile ovariene pentru orice dovadă a existenței de țesut ovarian. În acest caz, animalul nu se utilizează în calcule (3).

31. Începerea procedurii de ovariectomie se face cu animalul în poziție culcată ventrală, după ce acesta a fost anesteziat în mod corespunzător. Incizia de deschidere de aproximativ 1 cm a peretelui abdominal dorso-lateral se realizează longitudinal, la mijlocul distanței dintre marginea inferioară costală și creasta iliacă și câțiva milimetri lateral de marginea laterală a mușchiului lombar. Ovarul se îndepărtează din cavitatea abdominală pe un câmp aseptic. Ovarul se separă la joncțiunea dintre oviduct și organismul uterin. După ce se confirmă că nu există o sângerare masivă, peretele abdominal se închide prin suturi și pielea este închisă cu autoclipsuri sau sutură corespunzătoare. Punctele de ligatură sunt prezentate schematic în figura 1. Se utilizează analgezice postoperatorii adecvate, conform recomandării unui medic veterinar cu experiență în îngrijirea rozătoarelor.

▼M5

Greutatea corporală

32. În metoda adult-OVX, greutatea corporală și greutatea uterului nu sunt corelate, deoarece greutatea uterului este afectată de hormoni precum estrogenii, dar nu și de factori de creștere care reglementează dimensiunea corporală. Dimpotrivă, greutatea corporală este legată de greutatea uterului în modelul imatur, în timp ce acesta se maturizează (34). Astfel, la începutul studiului, diferențele de greutate între animalele utilizate în modelul imatur trebuie să fie minime și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie. Aceasta înseamnă că dimensiunea cuibului trebuie să fie standardizată de crescător, pentru a se asigura că puii de la diferite animale materne vor fi hrăniți aproximativ la fel. Animalele trebuie distribuite în grupuri (atât grupuri martor, cât și grupuri tratate) prin distribuirea aleatorie a greutății, astfel încât greutatea medie a fiecărui grup să nu fie diferită din punct de vedere statistic de cea a oricărui alt grup. Ar trebui să se acorde atenție pentru a evita, pe cât posibil, atribuirea unor pui din același cuib în același grup de tratament, fără a crește numărul de cuiburi care urmează să fie utilizate pentru investigație.

Dozare

33. Pentru a stabili dacă o substanță chimică de testat poate avea efect estrogenic *in vivo*, două grupuri de tratament și un grup martor sunt în mod normal suficiente și, prin urmare, acest concept este preferat, din motive de bunăstare a animalelor. În cazul în care scopul este de a obține o curbă doză-răspuns sau pentru a extrapola la doze mai mici, sunt necesare cel puțin 3 grupuri de tratament. În cazul în care sunt necesare mai multe informații în afară de identificarea activității estrogenice (cum ar fi o estimare a potenței), ar trebui să fie luat în considerare un regim de administrare diferit. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate. Dacă se folosește un vehicul la administrarea substanței de testat, grupul martor trebuie să primească aceeași cantitate de vehicul utilizată la grupurile tratate (sau cel mai mare volum utilizat la grupurile tratate, dacă acesta diferă între grupuri).

34. Obiectivul în cazul biotestului uterotrofic este selectarea de doze care să garanteze supraviețuirea animalelor și care nu prezintă toxicitate semnificativă sau suferință pentru animale după trei zile consecutive de administrare a substanței chimice până la o doză maximă de 1 000 mg/kg/zi. Toate dozele se propun și se selecționează ținându-se cont de toate datele existente privind toxicitatea și datele (toxico)cinetice disponibile pentru substanța testată sau materialele asociate. Nivelul cel mai ridicat de doză trebuie să țină seama, în primul rând, de informații privind LD_{50} și/sau toxicitatea acută pentru a evita decesul, suferințe grave sau stresarea animalelor (24) (25) (26). Cea mai mare doză reprezintă doza maximă tolerată (DMT); s-ar accepta, de asemenea, un studiu efectuat la un nivel al dozei care a indus o reacție uterotrofică pozitivă. Ca partajare, sunt în general acceptabile intervale mari (de exemplu, o semiunitate logaritmică corespunzătoare unei progresii a dozei de 3,2 sau chiar până la o unitate logaritmică) între doze. Dacă nu există informații relevante disponibile, se poate realiza un studiu preliminar pentru stabilirea nivelurilor dozelor cu scopul de a contribui la stabilirea dozelor de administrat.

35. Alternativ, în cazul în care potența estrogenică a unui agonist poate fi estimată utilizând date *in vitro* (sau *in silico*), acestea pot fi luate în considerare pentru selectarea dozei. De exemplu, cantitatea de substanță de testat care ar produce reacții uterotrofice echivalente cu agonistul de referință (etinilestradiol) este estimată prin potențialele sale relative *in vitro* la etinilestradiol. Cea mai mare doză de test ar fi obținută prin multiplicarea dozei echivalente cu un factor corespunzător, de exemplu 10 sau 100.

▼M5

Considerații privind stabilirea nivelurilor dozelor

36. În cazul în care este necesar, se poate efectua un studiu preliminar pentru stabilirea nivelurilor dozelor pe câteva animale. În acest sens, se poate utiliza documentul de orientare nr. 19 al OCDE (25) care definește semnele clinice care indică toxicitate sau suferința animalelor. În cazul în care este posibil în cadrul studiului de stabilire a nivelurilor dozelor, după trei zile de administrare, uterele pot fi excizate și cântărite aproximativ la 24 de ore după administrarea ultimei doze. Datele pot fi utilizate ulterior pentru a contribui la conceperea studiului principal (selectarea dozelor maxime acceptabile și a dozelor scăzute și recomandarea numărului de grupuri tratate).

Administrarea dozelor

37. Substanța de testat se administrează prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. La alegerea căii de administrare, se ține seama de considerente legate de bunăstarea animalelor, precum și de aspecte toxicologice, cum ar fi relevanța pentru calea de expunere umană la substanța chimică (de exemplu, oral prin gavaj la modelul de ingerare, injectare subcutanată la modelul de inhalare sau adsorbție cutanată), proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat și, în special, informațiile toxicologice existente și datele cu privire la metabolism și cinetică (de exemplu, necesitatea de a evita primul pasaj metabolic, o mai bună eficiență prin utilizarea unei anumite căi).

38. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase. Cu toate acestea, deoarece majoritatea liganzilor estrogenului sau precursorii lor metabolici tind să fie hidrofobi, cea mai comună abordare este de a utiliza o soluție/suspensie în ulei (de exemplu, ulei de porumb, de arahide, de susan sau de măsline). Cu toate acestea, astfel de uleiuri au conținuturi calorice și de grăsime diferite, astfel că vehiculul ar putea afecta energia metabolizabilă (EM) totală, ceea ce ar putea afecta obiectivele măsurate, cum ar fi greutatea uterului, în special în cadrul metodei imature (33). Prin urmare, înainte de studiu, orice vehicul care va fi utilizat se testează în comparație cu grupuri martor fără vehicule. Substanțele chimice de testat se pot dizolva într-o cantitate minimă de etanol 95 % sau alți solvenți adecvați și pot fi diluate la concentrații de lucru finale în vehiculul testat. Trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale solventului și acesta se testează într-un grup martor separat numai cu solvent. În cazul în care substanța de testat este considerată stabilă, se poate utiliza o încălzire ușoară și acțiune mecanică viguroasă pentru a contribui la dizolvarea substanței de testat. Trebuie să se determine stabilitatea substanței de testat în vehicul. În cazul în care substanța de testat este stabilă pe durata studiului, se poate prepara o alicotă de pornire din substanța de testat, iar diluțiile de dozare specificate se prepară zilnic.

39. Calendarul de dozare va depinde de modelul utilizat (a se vedea punctul 29 pentru modelul imatur și punctul 30 pentru modelul adult-OVX). Șobolanilor femele imature li se administrează substanța de testat zilnic timp de trei zile consecutive. Un tratament de trei zile se recomandă, de asemenea, pentru șobolanii femele ovariectomizate, dar expuneri mai lungi sunt acceptabile și pot îmbunătăți detectarea substanțelor chimice slab active. La șoarecii femele ovariectomizate, perioada de aplicare de 3 zile este suficientă, fără un avantaj semnificativ al unei extinderi de până la șapte zile pentru agoniști estrogenici puternici; cu toate acestea, o astfel de relație nu a fost demonstrată pentru estrogenii slabi în studiul de validare (16), prin urmare, administrarea ar trebui prelungită până la 7 zile consecutive la șoarecii adulți-OVX. Doza se administrează aproximativ în același moment al zilei. Aceasta trebuie să se ajusteze, după cum este necesar, pentru a menține un nivel de doză constant în raport cu greutatea corporală a animalului (de exemplu, mg de substanță chimică de testat per kg de greutate corporală pe zi). În ceea ce privește volumul probei, caracterul variabil al acesteia, în funcție de greutatea corporală, ar trebui să fie redus la minimum prin ajustarea concentrației soluției de tratament pentru a se asigura un volum constant în funcție de greutatea corporală la toate nivelurile dozei și pentru toate căile de administrare.

▼M5

40. În cazul în care substanța de testat se administrează prin gavaj, aceasta ar trebui să se administreze animalelor într-o singură doză zilnică, utilizând o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat odată depinde de dimensiunea animalului de laborator. Trebuie să se urmeze orientările locale privind îngrijirea animalelor, dar volumul nu trebuie să depășească 5 ml/kg masă corporală, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care se pot utiliza 10 ml/kg masă corporală.

41. În cazul în care substanța de testat se administrează prin injectare subcutanată, acest lucru se realizează într-o singură doză zilnică. Dozele se administrează în regiunile dorso-scapulare sau lombare cu un ac steril (de exemplu, cu grosimea 23 sau 25) și o seringă pentru tuberculină. Raderea zonei de injectare este opțională. Se notează eventualele pierderi, scurgeri la punctul de injectare sau administrarea incompletă. Volumul total injectat per șobolan pe zi nu trebuie să depășească 5 ml/kg greutate corporală, împărțit în două locuri de injectare, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care pot fi utilizate 10 ml/kg greutate corporală.

Observații

Observații clinice și generale

42. Se recomandă realizarea de observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și chiar mai frecvent în cazul în care se observă semne de toxicitate. Observațiile se efectuează, de preferință, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Toate animalele sunt observate pentru simptome de mortalitate, morbiditate și semne clinice generale, cum ar fi schimbări la nivelul comportamentului, al pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, respirația anormală).

Greutatea corporală și consumul de hrană

43. Toate animalele se cântăresc zilnic cu o precizie de 0,1 g, începând chiar înainte de inițierea tratamentului, și anume, atunci când animalele sunt distribuite în grupuri. Ca măsurare opțională, se poate cântări cantitatea de alimente consumate per cușcă în perioada tratamentului prin cântărirea alimentatoarelor. Rezultatele consumului alimentar se exprimă în grame pe șobolan pe zi.

Disecția și măsurarea greutății uterului

44. Șobolanii sunt eutanasiați la douăzeci și patru de ore de la ultimul tratament. În mod ideal, ordinea autopsiei va fi aleatorie între grupuri pentru a evita progresia directă în sus sau în jos în grupurile tratate care ar putea afecta datele în mod subtil. Obiectivul biotestului este de a măsura greutatea uterului atât umed, cât și tamponat. Greutatea umedă include uterul și conținutul de fluid luminal. Greutatea tamponată este măsurată după ce conținutul luminal al uterului a fost exprimat și îndepărtat.

45. Înainte de disecție, vaginul va fi examinat pentru detectarea nivelului de deschidere la animalele imature. Procedura de disecție începe prin deschiderea peretelui abdominal începând de la simfiza pubiană. Ulterior, cornul și ovarele uterine, dacă sunt prezente, sunt desprinse de peretele abdominal dorsal. Vezica urinară și ureterele sunt îndepărtate de pe partea ventrală și laterală a uterului și a vaginului. Adeziunea fibroasă dintre rect și vagin se desprinde până când se pot identifica joncțiunea orificiului vaginal și pielea perineală. Uterul și vaginul sunt desprinse din corp prin incizia peretelui vaginal chiar deasupra joncțiunii dintre pielea perineală, astfel cum se arată în figura 2. Uterul se desprinde de peretele corpului prin tăierea cu grijă a mezenterului uterin la punctul de fixare a

▼M5

acestuia pe întreaga lungime a părții dorso-laterale a fiecărui corn uterin. După îndepărtarea din organism, manipularea uterului trebuie să fie suficient de rapidă pentru a evita deshidratarea țesuturilor. Pierderea de greutate datorată uscării devine mai importantă la țesuturile mici precum uterul (23). În cazul în care sunt prezente, ovarele sunt eliminate la nivelul oviductului, evitând pierderea de fluid luminal din cornul uterin. În cazul în care animalul a fost ovariectomizat, resturile se examinează pentru detectarea prezenței oricăror țesuturi ovariene. Se îndepărtează excesul de grăsime și țesut conjunctiv. Vaginul este îndepărtat din uter chiar sub colul uterin, astfel încât colul uterin să rămână cu corpul uterin, astfel cum se arată în figura 2.

46. Fiecare uter ar trebui transferat într-un recipient cântărit și marcat în mod unic (de exemplu, un vas petri sau din material plastic), acordându-se atenție în continuare pentru a evita deshidratarea înainte de cântărire (de exemplu, în recipient se poate plasa hârtie de filtru ușor umezită cu soluție salină). Uterul cu fluid luminal se cântărește cu o precizie de 0,1 mg (greutatea uterului umed).

47. Fiecare uter va fi prelucrat apoi în mod individual pentru a elimina fluidul luminal. Ambele coarne uterine vor fi perforate sau tăiate longitudinal. Uterul va fi amplasat pe hârtie de filtru ușor umezită (de exemplu, Whatman nr. 3) și apăsat ușor cu o a doua bucată de hârtie de filtru umezită pentru a elimina complet fluidul luminal. Uterul fără conținutul luminal se cântărește cu o precizie de 0,1 mg (greutatea uterului tamponat).

48. Greutatea uterului la sacrificare poate fi utilizată pentru a se asigura că nu s-a depășit vârsta corespunzătoare la șobolanul intact imatur, cu toate acestea, datele istorice ale sușei de șobolan utilizate de laborator sunt decisive în acest sens (a se vedea punctul 56 pentru interpretarea rezultatelor).

Investigații opționale

49. După cântărire, uterul poate fi fixat în formol 10 % tamponat neutru pentru a fi examinat histopatologic după colorarea cu hematoxilină și eozină (HE). Vaginul poate fi examinat în consecință (a se vedea punctul 9). În plus, se poate realiza măsurarea morfometrică a epiteliului endometrial pentru comparație cantitativă.

DATE ȘI RAPORT

Date

50. Datele studiului ar trebui să includă:

— numărul de animale la începutul testului;

— numărul și identitatea animalelor găsite moarte în timpul testului sau sacrificate pentru a nu suferi, precum și data și ora fiecăror decese și eutanasieri;

— numărul și identitatea animalelor care prezintă semne de toxicitate, precum și o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și severitatea oricăror efecte toxice; și

— numărul și identitatea animalelor care prezintă vreo leziune și o descriere a tipului de leziuni.

▼**M5**

51. Se consemnează datele individuale ale animalelor în ceea ce privește greutatea corporală, greutatea uterului umed și greutatea uterului tamponat. Se utilizează analizele statistice unilaterale ale agoniștilor pentru a determina dacă administrarea unui produs chimic de testare a condus la o creștere semnificativă statistic ($p < 0,05$) a greutății uterine. Se efectuează analize statistice corespunzătoare pentru a studia modificările legate de tratament la nivelul greutății uterului umed și tamponat. De exemplu, datele pot fi evaluate printr-o abordare de analiză de covarianță (ANCOVA), cu greutatea corporală la autopsie drept covariabilă. Se poate efectua o transformare logaritmică de stabilizare a varianței asupra datelor uterine înainte de analiza datelor. Testul Dunnett și Hsu este adecvat pentru efectuarea de comparații între perechi ale fiecărui grup tratat raportat la grupul martor pentru vehicul și pentru calcularea intervalelor de încredere. Reprezentarea grafică a rezidualelor studentizate pot fi utilizate pentru detectarea eventualelor valori aberante și pentru evaluarea omogenității varianțelor. Procedurile respective au fost aplicate în cadrul programului de validare al OCDE, utilizând PROC GLM în SAS (*Statistical Analysis System*) (Institutul SAS, Cary, NC), versiunea 8 (6) (7).

52. Un raport final va include:

Unitatea de testare:

— personalul responsabil și responsabilitățile acestuia în cadrul studiului;

— datele de la testul cu martor pozitiv de referință și datele martor pozitiv periodice (a se vedea punctele 26 și 27).

Substanța chimică de testat:

— caracterizarea substanțelor de testat;

— natura fizică și, acolo unde este cazul, proprietățile fizico-chimice;

— metoda și frecvența de preparare a diluțiilor;

— toate informațiile obținute cu privire la stabilitate;

— toate analizele soluțiilor de dozare.

Vehicul:

— caracterizarea vehiculului de testare (natura, furnizorul și lotul);

— justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

Animale de laborator:

— specia și sușa și justificarea alegerii acestora;

— furnizorul și unitatea specifică furnizorului;

— vârsta la furnizare cu data fătării;

— în cazul animalelor imature, dacă sunt furnizate cu sau fără mamă sau mamă adoptivă și data înțărcării;

— detalii privind procedura de aclimatizare a animalelor;

— numărul animalelor per cușcă;

— detalii și metoda de identificare a fiecărui animal și a grupului.

Condiții de testare:

— detalii privind procesul de selecție aleatorie (și anume, metoda utilizată);

— justificarea alegerii dozei;

▼M5

— detalii privind prepararea substanței de testat, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea;

— detalii privind administrarea substanței de testat și justificarea alegerii căii de expunere;

— hrana (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul și, dacă se cunosc, nivelurile de fitoestrogen);

— sursa de apă (de exemplu, apă de la robinet sau apă filtrată) și furnizare (prin tuburi de la un container mare, în sticle etc.);

— așternutul (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul);

— evidența condițiilor de plasare în cuști, intervalul de iluminat, temperatura și umiditatea spațiului, curățarea spațiului;

— descrierea detaliată a procedurilor de autopsie și de cântărire a greutății uterine;

— descrierea procedurilor statistice.

Rezultate

Pentru fiecare animal:

— toate greutățile corporale individuale zilnice (de la distribuirea în grupuri până la autopsie) (cu o precizie de 0,1 g);

— vârsta fiecărui animal (în zile, ziua fătării fiind considerată ziua 0) atunci când începe administrarea substanței de testat;

— data și ora fiecărei administrări a dozei;

— volumul calculat și dozajul administrat și observațiile cu privire la orice pierderi de dozaj în timpul sau ulterior administrării dozei;

— înregistrarea zilnică a stării animalelor, inclusiv simptome și observații relevante;

— presupusa cauză a decesului (în cazul în care animalul este descoperit în timpul studiului în stare muribundă sau mort);

— data și ora eutanasierii cu intervalul de timp până la ultima administrare a dozei;

— greutatea uterului umed (cu o precizie de 0,1 mg) și eventualele observații privind pierderile de fluid luminal în timpul disecției și a pregătirii pentru cântărire;

— greutatea uterului tamponat (cu o precizie de 0,1 mg).

Pentru fiecare grup de animale:

— greutatea corporală medie zilnică (cu o precizie de 0,1 g) și deviații standard (de la distribuirea în grupuri până la autopsie);

— greutatea medie a uterului umed și greutatea medie a uterului tamponat (cu o precizie de 0,1 mg) și deviațiile standard;

— în cazul în care se măsoară, consumul alimentar zilnic (calculat în grame de hrană consumată per animal);

▼M5

— rezultatele analizelor statistice de comparare a greutății uterului umed și a greutății uterului tamponat la grupurile tratate în raport cu aceleași măsurători la grupurile martor pentru vehicul;

— rezultatele analizei statistice de comparare a greutății corporale totale și a creșterii în greutate la grupurile tratate în raport cu aceleași măsurători la grupurile martor pentru vehicul.

53. Rezumat al elementelor de orientare importante ale metodei de testare

	Șobolan	Șoareci
Animale		
Sușa	Sușa de rozătoare de laborator utilizată în mod obișnuit	
Număr de animale	Cel puțin 6 animale în fiecare grup tratat	
Număr de grupuri	Cel puțin 2 grupuri de testare (a se vedea punctul 33 pentru orientare) și un grup martor negativ Pentru îndrumări cu privire la grupurile martor pozitiv, a se vedea punctele 26 și 27	
Condiții de adăpostire și de hrănire		
T° în încăperea în care se află animalele	22 °C ± 3 °C	
Umiditatea relativă	50-60 % și nu mai mică de 30 % sau mai mare de 70 %	
Alternanța zilnică a iluminatului	12 ore de lumină, 12 ore de întuneric	
Alimentația și apa potabile	Ad libitum	
Adăpost	Individual sau în grupuri de până la trei animale (pentru animalele imature se recomandă adăpostirea în grup social)	
Alimentația și așternutul	Se recomandă un nivel scăzut de fitoestrogeni în alimentație și așternut	
Protocol		
Metodă	Metoda imatură neovariectomizată (opțiunea preferată) Metoda femelelor adulte ovariectomizate	Metoda femelelor adulte ovariectomizate
Vârsta administrării pentru animalele imature	Cel mai devreme, PND 18. Tratarea trebui să se finalizeze înainte de PND 25	Nu este relevantă în domeniul de aplicare al prezentei metode de testare.
Vârsta ovariectomiei	Între 6 și 8 săptămâni.	
Vârsta administrării pentru animalele ovariectomizate	Între ovariectomie și prima zi de administrare trebuie să treacă cel puțin 14 zile.	Între ovariectomie și prima zi de administrare trebuie să treacă cel puțin 7 zile.
Greutatea corporală	Variația greutății corporale trebuie să fie minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie.	

▼M5

	Șobolan	Șoareci
Administrare		
Calea de administrare	Gavaj oral sau injectare subcutanată	
Frecvența administrării	Doză zilnică unică	
Volumul pentru gavaj și injectare	≤ 5ml/kg greutate corporală (sau până la 10 ml/kg greutate corporală în cazul soluțiilor apoase) (în 2 două locuri de injectare pentru calea subcutanată)	
Durata administrării	3 zile consecutive pentru modelul imatur Cel puțin 3 zile consecutive pentru modelul OVX	7 zile consecutive pentru modelul OVX
Momentul autopsiei	Aproximativ 24 de ore după ultima administrare	
Rezultate		
Răspuns pozitiv	Creștere semnificativă din punct de vedere statistic a greutății medii a uterului (umed și/sau tamponat)	
Estrogen de referință	17α-etinilestradiol	

ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR

54. În general, un test pentru detectarea estrogenicității este considerat pozitiv în cazul în care există o creștere semnificativă din punct de vedere statistic a greutății uterului ($p < 0,05$) cel puțin la niveluri mari de doze în comparație cu grupul martor pentru solvent. Un rezultat pozitiv este susținut, de asemenea, prin demonstrarea unei relații plauzibile din punct de vedere biologic și de magnitudinea răspunsului, având în vedere că activitățile estrogenice și antiestrogenice care se suprapun ale substanței chimice de testat pot afecta forma curbei doză-răspuns.

55. Trebuie să se acorde o atenție deosebită pentru a nu se depăși doza maximă tolerată, cu scopul de a permite o interpretare semnificativă a datelor. În acest sens, se analizează cu atenție reducerea greutății corporale, semnele clinice și alte constatări.

56. Un aspect important pentru acceptarea datelor din biotestul uterotrofic este greutatea uterină la animalele din grupul martor tratat cu vehicul. Valorile martor ridicate ar putea compromite capacitatea de reacție a biotestului și capacitatea de a detecta agoniștii estrogenici foarte slabi. Analiza literaturii de specialitate și datele obținute în cursul validării biotestului uterotrofic sugerează că, în special la animalele imature, cazurile unor valori medii martor ridicate nu apar spontan (2) (3) (6) (9). Întrucât greutatea uterului la șobolanii imaturi depinde de o serie de variabile, cum ar fi susa sau greutatea corporală, nu se poate prevedea nicio limită superioară definitivă pentru greutatea uterului. Ca orientare, dacă greutatea uterului tamponat la șobolanii martor imaturi este cuprinsă între 40 și 45 mg, rezultatele ar trebui să fie considerate suspecte, iar greutatea uterului de peste 45 mg poate conduce la reluarea testului. Acest aspect se examinează însă de caz la caz (3) (6) (8). La testarea șobolanilor adulți, ovariectomia incompletă va lăsa țesuturi ovariene care pot produce estrogen endogen și pot întârzia regresia greutății uterului.

▼**M5**

57. Greutatea uterului tamponat al grupului martor pentru vehicul sub 0,09 % din greutatea corporală pentru șobolanii femele imature și sub 0,04 % pentru femele adulte tinere ovariectomizate pare să producă rezultate acceptabile [a se vedea tabelul 31 (2)]. În cazul în care greutatea uterului are valori mai mari la grupul martor decât cifrele respective, se examinează diverși factori, inclusiv vârsta animalelor, ovariectomia corespunzătoare, fitoestrogeni alimentari etc., iar un rezultat negativ la test (niciun semn de activitate estrogenică) ar trebui utilizat cu prudență.

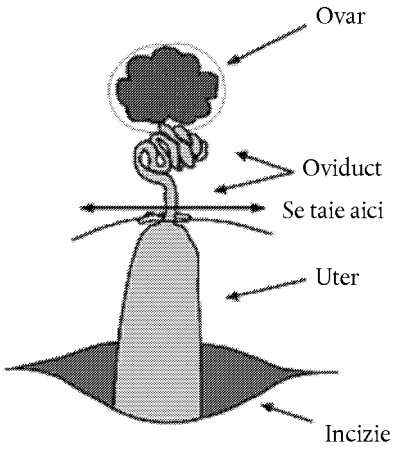
58. Datele istorice pentru grupurile martor se păstrează în laborator. Datele istorice pentru reacții la estrogeni de referință pozitivi, cum ar fi 17a-etinilestradiol, se păstrează, de asemenea, în laborator. Laboratoarele pot testa, de asemenea, reacția la agoniști estrogenici slabi cunoscuți. Toate datele obținute pot fi comparate cu datele disponibile (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) pentru a se asigura că metodele laboratorului furnizează suficientă sensibilitate.

59. Valorile greutății uterului tamponat au manifestat mai puțină variabilitate în cursul studiului de validare al OCDE decât valorile greutății uterului umed (6) (7). Cu toate acestea, un răspuns semnificativ pentru oricare dintre măsurători ar indica faptul că substanța de testat este pozitivă pentru activitate estrogenică.

60. Răspunsul uterotrofic nu este în întregime de origine estrogenică; cu toate acestea, un rezultat pozitiv al biotestului uterotrofic este, în general, interpretat ca o dovadă de potențial estrogenic *in vivo* și, în mod normal, ar trebui să inițieze acțiuni pentru clarificări suplimentare (a se vedea punctul 9 și „Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini”, anexa 2).

Figura 1

Reprezentare schematică ilustrând îndepărtarea chirurgicală a ovarelor



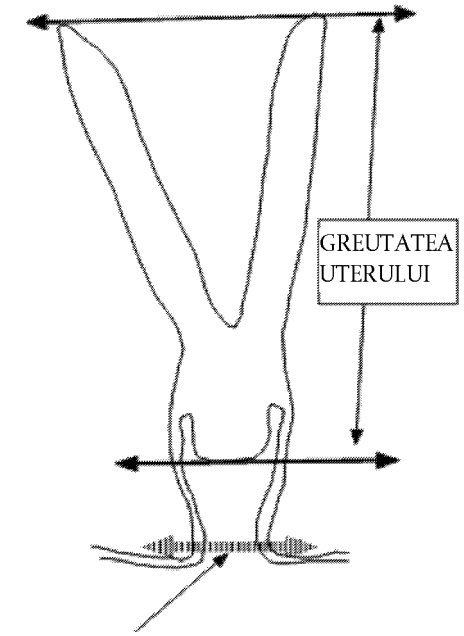
Mezenterul, rețeaua vasculară și stratul de grăsime nu sunt reprezentate

Procedura începe prin deschiderea peretelui dorso-lateral abdominal la mijlocul distanței dintre marginea inferioară costală și creasta iliacă și câțiva milimetri lateral de marginea laterală al mușchiului lombar. În cavitatea abdominală, se localizează ovarele. Ulterior, ovarele sunt îndepărtate fizic din cavitatea abdominală pe un câmp aseptic, se realizează o ligatură între ovare și uter pentru a controla sângerarea, iar ovarul este detașat prin incizie deasupra ligaturii la joncțiunea dintre oviduct și fiecare corn uterin. După ce se confirmă absența unei sângerări semnificative, peretele abdominal este închis prin suturi, iar pielea este închisă, de exemplu, prin autoclipsuri sau sutură. Trebuie să se permită ca animalele să își revină și greutatea uterului să regreseze timp de cel puțin 14 zile înainte de utilizare.

▼**M5**

Figura 2

Îndepărtarea și pregătirea țesuturilor uterine pentru măsurarea greutății



Procedura începe prin deschiderea peretelui abdominal la simfiza pubiană. Ulterior, fiecare ovar, dacă sunt prezente, și cornul uterin sunt desprinse de peretele abdominal dorsal. Vezica urinară și ureterele sunt îndepărtate de pe partea ventrală și laterală a uterului și a vaginului. Adeziunea fibroasă dintre rect și vagin se desprinde până când se pot identifica joncțiunea orificiului vaginal și pielea perineală. Uterul și vaginul sunt desprinse din corp prin incizia peretelui vaginal chiar deasupra joncțiunii dintre pielea perineală, astfel cum se arată în figură. Uterul se desprinde de peretele corpului, prin tăierea cu grijă a mezenterului uterin la punctul de fixare a acestuia pe întreaga lungime a părții dorso-laterale a fiecărui corn uterin. După scoaterea din organism, se îndepărtează excesul de grăsime și țesutul conjunctiv. În cazul în care sunt prezente, ovarele se îndepărtează la nivelul oviductului, evitând pierderea de fluid luminal din cornul uterin. În cazul în care animalul a fost ovariectomizat, resturile sunt examinate pentru detectarea prezenței oricăror țesuturi ovariene. Se îndepărtează excesul de grăsime și de țesut conjunctiv. Vaginul este îndepărtat din uter chiar sub colul uterin, astfel încât colul uterin să rămână cu corpul uterin, astfel cum se arată în figură. Uterul poate fi apoi cântărit.

▼**M5**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Antiestrogenicitate înseamnă capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea estradiolului 17ß într-un organism mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

Data fătării este ziua 0 după fătare.

Administrarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării.

Doză înseamnă cantitatea de substanță testată administrată. Pentru biotestul uterotrofic, doza este exprimată ca greutate de substanță chimică pe unitatea de greutate corporală a animalului de laborator pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi).

Doză maximă tolerată (DMT) înseamnă cea mai mare cantitate de o substanță chimică care, atunci când este introdusă în organism, nu ucide animalele de laborator (notată cu DL_0) (IUPAC, 1993).

Estrogenicitate înseamnă capacitatea unui produs chimic de a acționa în mod similar cu estradiolul 17ß într-un organism mamifer.

Ziua X după fătare înseamnă ziua X de viață după ziua fătării.

Sensibilitate înseamnă proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active care sunt clasificate în mod corect prin intermediul testului. Aceasta este o măsurare a preciziei pentru o metodă de testare care produce rezultate categorice și este un element important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

Specificitate înseamnă proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive care sunt clasificate în mod corect prin intermediul testului. Aceasta este o măsurare a preciziei pentru o metodă de testare care produce rezultate categorice și este un element important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testate utilizând prezenta metodă de testare.

Uterotrofic este un termen utilizat pentru a descrie o influență pozitivă asupra creșterii țesuturilor uterine.

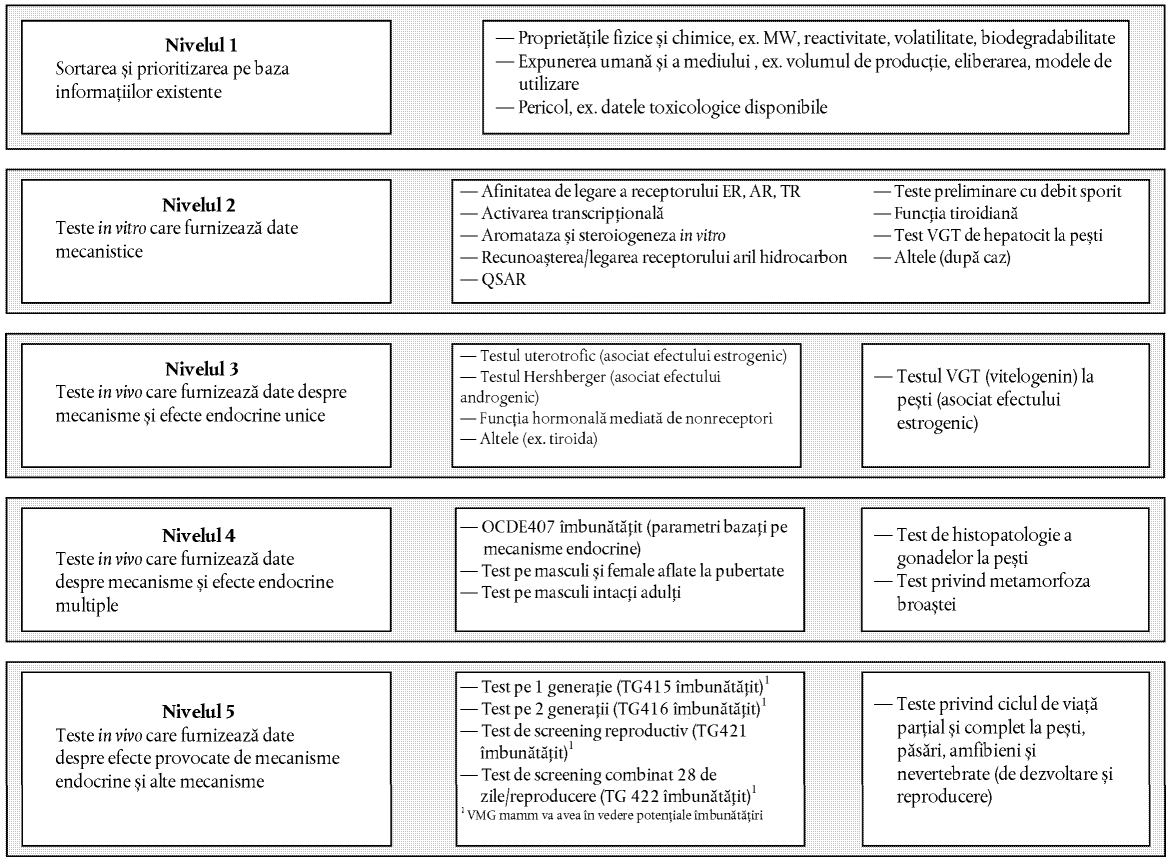
Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

▼M5

Apendicele 2

Notă: Document elaborat de Secretariatul programului privind orientările referitoare la testare pe baza acordului încheiat în cadrul celei de-a 6-a reuniuni a grupului de lucru privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (EDTA)

Cadrul conceptual OCDE privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini



VMG mamm: Grupul de gestionare privind validarea testelor și a evaluării la mamifere

▼**M5**

NOTE LA CADRU:

Nota 1: Intrarea la toate nivelurile și ieșirea la toate nivelurile sunt posibile și depind de natura nevoilor de informații existente în scopul evaluării riscurilor și a pericolelor.

Nota 2: La nivelul 5, ecotoxicologia trebuie să includă parametri care să indice mecanisme de efecte adverse și eventuala vătămare a populației.

Nota 3: În cazul în care un model multimodal acoperă mai multe teste cu parametru unic, modelul respectiv ar înlocui utilizarea testelor cu parametru unic în cauză.

Nota 4: Evaluarea fiecărei substanțe chimice se efectuează de la caz la caz, ținând cont de toate informațiile disponibile, având în vedere funcția nivelurilor cadrului.

Nota 5: Nu trebuie să se considere că în prezent cadrul include toate testele. La nivelurile 3, 4 și 5, acesta include teste care sunt disponibile sau care sunt în curs de validare. Acestea din urmă sunt incluse cu titlu provizoriu. După dezvoltarea și validarea lor, acestea vor fi adăugate în mod oficial în cadru.

Nota 6: Nu trebuie să se considere că nivelul 5 include doar teste definitive. Se consideră că testele incluse la acest nivel contribuie la evaluarea generală a riscurilor și a pericolelor.

▼M5

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549.

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369-373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343-347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596-601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320-333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33-41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288-305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284-291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (12): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European şi a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri ştiinţifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

▼M5

B.55. **BIOTESTUL HERSHBERGER LA ȘOBOLANI: UN TEST DE DEPISTARE PE TERMEN SCURT PENTRU SUBSTANȚE CU PROPRIETĂȚI (ANTI)ANDROGENICE**

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 441 (2009). OCDE a inițiat în 1998 o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibililor perturbatori endocrini (1). Un element al activității a fost elaborarea de orientări privind testarea referitoare la biotestul Hershberger la șobolani. După mai multe decenii de utilizare de către industria farmaceutică, testul a fost standardizat de către un comitet oficial de experți în 1962 ca instrument de depistare a substanțelor chimice androgenice (2). În perioada 2001-2007, biotestul Hershberger la șobolani a fost supus unui amplu program de validare, inclusiv generarea unui document de revizuire a fondului (23), elaborarea unei lucrări detaliate privind metodele (3), dezvoltarea unui ghid de disecție (21) și desfășurarea de ample studii intra- și interlaboratoare pentru a demonstra fiabilitatea și reproductibilitatea biotestului. Studiile de validare au fost efectuate cu un androgen de referință puternic [propionat de testosteron (PT)], doi androgeni sintetici puternici (acetat de trenbolon și metil testosteron), un medicament antiandrogenic puternic (flutamida), un inhibitor puternic (finasterida) al sintezei androgenului natural (dihidrotestosteron-DHT), mai multe pesticide slab antiandrogenice (linuron, vinclozolin, procimidon, p,p' DDE), un inhibitor puternic al 5a reductazei (finasterida) și două substanțe chimice negative cunoscute (dinitrofenol și nonilfenol) (4) (5) (6) (7) (8). Prezenta metodă de testare este rezultatul îndelungatei experiențe istorice a biotestelor, precum și a experienței dobândite în timpul programului de validare a testului și a rezultatelor astfel obținute.

2. Biotestul Hershberger este un test de depistare *in vivo* pe termen scurt care utilizează țesuturi aferente tractului reproducător masculin. Testul își are originea în anii 1930 și a fost modificat în anii 1940 pentru a include mușchii sensibili la androgeni din tractul genital masculin (2) (9-15). În anii 1960, peste 700 de posibili androgeni au fost evaluați utilizând o versiune standardizată a protocolului (2) (14), iar utilizarea testului pentru androgeni și antiandrogeni a fost considerată o metodă standard în anii 1960 (2) (15). Biotestul actual se bazează pe modificările în greutate a cinci țesuturi dependente de androgeni la șobolanul mascul peripubertal castrat. Acesta evaluează capacitatea unei substanțe chimice de a provoca activități biologice în concordanță cu agoniștii sau antagoniștii de androgen sau inhibitorii de 5α-reductază. Cele cinci țesuturi țintă dependente de androgeni incluse în prezenta metodă de testare sunt prostata ventrală (PV), veziculele seminale (VS) (plus fluide și glande coagulante), mușchiul *levator ani bulbocavernosus* (LABC), glandele pereche Cowper (COW) și glandul penisului (GP). La șobolanul mascul peripubertal castrat, cele cinci țesuturi răspund toate la androgeni cu o creștere în greutate în termeni absoluți. În cazul în care aceleași țesuturi sunt stimulate să crească în greutate prin administrarea unui androgen de referință puternic, cele cinci țesuturi răspund la antiandrogeni cu o scădere în greutate în termeni absoluți. Principalul model pentru biotestul Hershberger a fost masculul peripubertal castrat prin metode chirurgicale, care a fost validat pentru fazele 1, 2 și 3 din programul de validare Hershberger.

3. Biotestul Hershberger servește ca un test mecanicist de depistare *in vivo* pentru detectarea de agoniști de androgeni, antagoniști de androgeni și inhibitori de 5a-reductază și aplicarea acestuia trebuie văzută în contextul „Cadrului conceptual al OCDE de testare și evaluare a perturbatorilor endocrini” (apendicele 2). Cadrul conceptual conține biotestul Hershberger la

▼M5

nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la un singur mecanism endocrin, și anume, (anti)androgenicitatea. Acesta este destinat să fie inclus într-o baterie de teste *in vitro* și *in vivo* pentru a identifica substanțele chimice cu potențial de a interacționa cu sistemul endocrin, conducând în cele din urmă la evaluări de risc și de pericol pentru sănătatea umană sau pentru mediu.

4. Datorită preocupărilor pentru bunăstarea animalelor legate de procedura de castrare, s-a căutat masculul înțărcat stimulat (necastrat) ca model alternativ pentru biotestul Hershberger pentru a evita etapa castrării. Metoda de testare la animale înțărcate stimulate a fost validată (24); cu toate acestea, în studiile de validare, versiunea cu animale înțărcate a biotestului Hershberger nu părea capabilă să detecteze în mod constant efectele asupra valorilor greutății organelor dependente de androgeni de antiandrogenii slabi la dozele testate. Prin urmare, aceasta nu a fost inclusă în metoda de testare. Cu toate acestea, recunoscând că utilizarea sa poate oferi nu numai beneficii legate de bunăstarea animalelor, ci, de asemenea, poate să furnizeze informații privind alte moduri de acțiune, aceasta este disponibilă în documentul de orientare al OCDE nr. 115 (25).

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

5. Agoniștii și antagoniștii de androgen acționează ca liganzi pentru receptorul de androgen și pot activa sau inhiba, respectiv, transcrierea genică controlată de receptor. În plus, unele substanțe chimice inhibă conversia testosteronului în androgenul natural mai puternic dihidrotestosteron în anumite țesuturi vizate de androgen (inhibitori de 5a-reductază). Astfel de produse chimice au potențialul de a conduce la pericole pentru sănătate, inclusiv efecte asupra reproducerii și dezvoltării. Prin urmare, există necesitatea de reglementare pentru testarea și evaluarea rapidă a unui produs chimic ca un posibil agonist sau antagonist de androgen sau inhibitor de 5a-reductază. Deși informativă, afinitatea unui ligand pentru un receptor de androgen, măsurată prin legarea receptorului sau activarea transcripției genelor reporter *in vitro*, nu este singurul factor determinant al unui posibil pericol. Alți factori determinanți includ activarea și dezactivarea metabolică la intrarea în corp, distribuția substanței chimice la țesuturile țintă și eliminarea din corp. Aceasta conduce la necesitatea de a depista posibila activitate a unei substanțe chimice *in vivo* în condiții și la o expunere relevante. Evaluarea *in vivo* este mai puțin critică în cazul în care sunt cunoscute caracteristicile substanței chimice referitoare la absorbție — distribuție — metabolism — eliminare (ADME). Țesuturile dependente de androgeni răspund cu o creștere rapidă și viguroasă la stimularea cu androgeni, în special la șobolanii masculi peripubertali castrați. Speciile de rozătoare, în special șobolanul, sunt utilizate, de asemenea, pe scară largă în studiile de toxicitate pentru caracterizarea riscurilor. Prin urmare, versiunea testului care utilizează șobolanul peripubertal castrat și cele cinci țesuturi țintă ale testului este adecvată pentru depistarea *in vivo* a agoniștilor și antagoniștilor de androgen și a inhibitorilor de 5a-reductază.

6. Prezenta metodă de testare se bazează pe protocoalele utilizate în studiul de validare al OCDE, care s-au dovedit a fi fiabile și reproductibile în cadrul studiilor intra- și interlaboratoare (4) (5) (6) (7) (8). În cadrul metodei de testare sunt prezentate procedurile referitoare atât la androgeni, cât și la antiandrogeni.

7. Deși au existat unele variații în doza de PT utilizată pentru a detecta antiandrogenii în programul de validare al OCDE pentru biotestul Hershberger efectuat de laboratoare diferite (0,2 față de 0,4 mg/kg/zi, injectare subcutanată), există o foarte mică diferență între cele două variații ale protocolului în ceea ce privește capacitatea de a detecta activitate antiandrogenică slabă sau puternică. Cu toate acestea, este clar că doza de PT nu trebuie să fie prea ridicată pentru a bloca efectele antagoniștilor receptorilor de androgen (RA) slabi, dar nici atât de scăzută încât țesuturile androgenice să prezinte un răspuns de creștere foarte scăzut chiar și fără coadministrare de antiandrogeni.

▼M5

8. Răspunsul de creștere al țesuturilor individuale dependente de androgeni nu este în totalitate de origine androgenică, însemnând că substanțe chimice altele decât agoniștii de androgen pot modifica greutatea anumitor țesuturi. Cu toate acestea, răspunsul de creștere al mai multor țesuturi în mod concomitent fundamentează un mecanism cu un specific androgenic mai ridicat. De exemplu, doze mari de estrogeni puternici pot provoca o creștere a greutății veziculelor seminale; cu toate acestea, celelalte țesuturi dependente de androgeni din cadrul testului nu răspund în mod similar. Substanțele chimice antiandrogenice pot acționa fie ca antagoniști ai receptorilor de androgen, fie ca inhibitori de 5a-reductază. Inhibitorii de 5a-reductază au un efect variabil, întrucât conversia la dihidrotestosteronul mai puternic variază în funcție de țesut. Antiandrogenii care inhibă 5a-reductaza, cum ar fi finasterida, au efecte mai pronunțate la nivelul prostatei ventrale decât la alte țesuturi, comparativ cu un antagonist RA puternic precum flutamida. Diferența la nivelul răspunsului țesutului poate fi utilizată pentru a diferenția între modurile de acțiune mediate de RA și cele mediate de 5a-reductază. În plus, receptorul de androgen este înrudit din punct de vedere evolutiv cu cel al altor hormoni steroizi, iar alte tipuri de hormoni, atunci când sunt administrate la niveluri de dozare ridicate, supra-fiziologice, pot lega și antagoniza efectele de stimulare a creșterii ale PT (13). Mai mult, este plauzibil, de asemenea, că metabolismul steroid ridicat și o scădere ulterioară a nivelului de testosteron seric ar putea reduce creșterea țesutului dependent de androgeni. Prin urmare, orice rezultat pozitiv în cadrul biotestului Hershberger se evaluează în mod normal utilizând o abordare bazată pe forța probantă a dovezilor, inclusiv teste *in vitro*, cum ar fi testele de legare a RA și a receptorului de estrogen (RE) și testele de activare a transcripției genice corespunzătoare sau alte teste *in vivo* care examinează țesuturi similare vizate de androgeni, de exemplu, testul pe masculi puberali, testul pe masculi adulți intacți la 15 zile sau studii cu doze repetate la 28 de zile sau 90 de zile.

9. Experiența arată că androgenii xenobiotici sunt mai rari decât antiandrogenii xenobiotici. Prin urmare, se așteaptă ca biotestul Hershberger să fie utilizat cel mai adesea pentru depistarea antiandrogenilor. Cu toate acestea, procedura de testare pentru detectarea androgenilor ar putea să fie recomandată pentru substanțe steroide sau similare steroizilor sau substanțe pentru care o indicație de posibile efecte androgenice rezultă din metodele incluse la nivelul 1 sau 2 din cadrul conceptual (apendicele 2). În mod similar, efectele nocive asociate cu profile (anti)androgenice pot fi observate la testele de nivel 5, ceea ce a condus la necesitatea de a se evalua dacă o substanță chimică funcționează pe baza unui mod de acțiune asupra sistemului endocrin.

10. Este recunoscut faptul că toate procedurile bazate pe animale trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator; descrierile îngrijirii și ale tratamentului prezentate mai jos sunt standardele minime de performanță și sunt prevalate de reglementările locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (26). OCDE oferă orientări suplimentare privind tratamentul uman al animalelor de laborator (17).

11. La fel precum în toate testele care utilizează animale de laborator, se analizează atent necesitatea efectuării studiului. În esență, pot exista două motive pentru o astfel de decizie:

— potențial ridicat de expunere (nivelul 1 al cadrului conceptual) sau indicații de (anti)androgenicitate în testele *in vitro* (nivelul 2) care susțin necesitatea unor investigații pentru a verifica dacă astfel de efecte pot să apară *in vivo*;

— efecte indicând (anti)androgenicitate în teste *in vivo* de la nivelul 4 sau 5 care susțin necesitatea unor investigații privind modul specific de acțiune, de exemplu, pentru a determina dacă efectele s-au datorat unui mecanism (anti)androgenic.

▼M5

12. Definițiile utilizate în prezenta metodă de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

13. Biotestul Hershberger își atinge sensibilitatea utilizând masculi cu o producție minimă de androgen endogen. Acest lucru se realizează prin utilizarea de masculi castrați, cărora li s-a acordat un timp adecvat după castrare pentru ca țesuturile țintă să regreseze la o greutate de referință minimă și uniformă. Astfel, atunci când se efectuează un test de depistare a potențialului de activitate androgenică, există niveluri scăzute de androgeni endogeni în circulație, axul hipotalamo-pituitar-gonadal este pus în imposibilitatea de a compensa prin mecanisme de feedback, capacitatea de răspuns a țesuturilor este maximizată și variabilitatea greutății de pornire a țesutului este redusă la minimum. În cazul în care se efectuează un test de depistare a unei potențiale activități antiandrogenice, se poate atinge o creștere mai consistentă a greutății țesutului atunci când țesuturile sunt stimulate de un androgen de referință. Ca urmare, biotestul Hershberger necesită doar 6 animale per grup de doză, în timp ce alte teste cu masculi puberali sau adulți intacți sugerează utilizarea a 15 masculi per grup de doză.

14. Castrarea șobolanilor masculi peripubertali se realizează în mod corespunzător utilizând o tehnică septică și anestezie aprobată. În primele zile în urma intervenției chirurgicale se administrează analgezice pentru a elimina disconfortul postchirurgical. Castrarea îmbunătățește precizia testării pentru detectarea androgenilor și a antiandrogenilor slabi prin eliminarea mecanismelor compensatorii de reacție ale sistemului endocrin prezente la animalele intacte care atenuează efectele androgenilor și ale antiandrogenilor administrați și prin eliminarea variabilității interindividuale ridicate la nivelul testosteronului seric. Prin urmare, castrarea reduce numărul de animale necesare pentru depistarea activităților respective la nivelul sistemului endocrin.

15. Atunci când se efectuează un test de depistare a activității androgenice, substanța de testat se administrează zilnic prin gavaj oral sau injectare subcutanată (SC) timp de zece zile consecutive. Substanțele chimice de testat se administrează la cel puțin două grupuri de animale de experiență, cu un singur nivel de doză per grup. Animalele sunt supuse autopsiei la aproximativ 24 de ore după ultima administrare. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic la două sau mai multe valori ale greutății organelor țintă pentru grupurile tratate cu substanța de testat comparativ cu grupul martor pentru vehicul indică faptul că substanța de testat este pozitivă pentru activitate androgenă potențială (a se vedea punctul 60). Androgenii, cum ar fi trenbolon, care nu pot fi reduși-5a, au efecte mai pronunțate asupra LABC și GP comparativ cu PT, dar toate țesuturile ar trebui să manifeste o creștere ridicată.

16. Atunci când se efectuează un test de depistare a potențialei activități antiandrogenice, substanța de testat se administrează zilnic prin gavaj oral sau injectare subcutanată timp de zece zile consecutive în mod concertat cu doze zilnice de PT (0,2 sau 0,4 mg/kg/zi) prin injectare SC. În programul de validare s-a stabilit că se poate utiliza o doză de 0,2 sau 0,4 mg/kg/zi de PT, întrucât ambele au fost eficace în detectarea de antiandrogeni, în consecință, trebuie selectată doar o doză pentru a fi utilizată în testare. Doze gradate de substanță de testat se administrează la un minim de trei grupuri tratate de animale de experiență, utilizând un nivel de doză pe grup. Animalele sunt supuse autopsiei aproximativ la 24 de ore după ultima doză. O scădere semnificativă statistic la nivelul a două sau mai multe valori ale greutății organelor țintă pentru grupurile tratate cu substanța de testat plus PT comparativ cu grupul martor căruia i se administrează doar PT indică faptul că substanța de testat este pozitivă pentru o potențială activitate antiandrogenică (a se vedea punctul 61).

▼M5

DESCRIEREA METODEI

Selectarea speciei și sușei de animale

17. Șobolanul a fost utilizat în mod obișnuit în biotestul Hershberger încă din anii 1930. Deși este plauzibil din punct de vedere biologic că atât șobolanul, cât și șoarecele vor manifesta răspunsuri similare, pe baza a 70 de ani de experiență cu modelul pe șobolani, șobolanul este specia preferată pentru biotestul Hershberger. În plus, din moment ce datele biotestului Hershberger pot fi preliminare pentru un studiu pe mai multe generații pe termen lung, acest lucru permite utilizarea de animale din aceeași specie, sușă și sursă în ambele studii.

18. Protocolul permite ca laboratoarele să selecteze sușa de șobolan care va fi utilizată și care trebuie, în general, să fie cea utilizată din punct de vedere istoric de laboratorul participant. Pot fi utilizate sușele de șobolan de laborator folosite în mod obișnuit; cu toate acestea, nu se utilizează sușele care se maturizează mult mai târziu de 42 de zile, deoarece castrarea masculilor la vârsta de 42 de zile poate exclude măsurarea valorilor greutății glandului penisului, care poate fi efectuată doar după separarea prepuțului de trunchiul penisului. Astfel, nu se utilizează sușe derivate de la șobolanul Fisher 344, cu excepția unor cazuri rare. Șobolanul Fisher 344 are un calendar diferit al dezvoltării sexuale comparativ cu alte sușe utilizate mai frecvent, cum ar fi sușele Sprague Dawley sau Wistar (16). În cazul în care se va utiliza o astfel de sușă, laboratorul trebuie să castreze animalele la o vârstă puțin mai mare și să poată demonstra sensibilitatea sușei utilizate. Laboratorul trebuie să prezinte clar justificarea pentru alegerea sușei de șobolan. În cazul în care testul de depistare ar putea preceda un studiu cu doză orală repetată, un studiu privind reproducerea și dezvoltarea sau un studiu pe termen lung, se utilizează de preferință animale din aceeași sușă și sursă în toate studiile.

Condiții de adăpostire și de hrănire

19. Toate procedurile trebuie să fie în conformitate cu standardele locale de îngrijire a animalelor de laborator. Descrierile îngrijirii și ale tratamentului sunt standarde minime și vor fi prevalate de reglementări locale, cum ar fi Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (26). În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (cu un interval aproximativ, ± 3 °C). Se asigură o umiditate relativă cu valoarea minimă de 30 % și valoarea maximă de 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Obiectivul ar fi o umiditate relativă de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial. Alternanța zilnică a iluminatului trebuie să fie de 12 ore de lumină, 12 ore de întuneric.

20. Adăpostirea în grup este preferabilă izolării, din cauza vârstei tinere a animalelor și a faptului că șobolanii sunt animale sociale. Adăpostirea a două sau trei animale per cușcă evită aglomerarea și stresul asociat, care pot interfera cu controlul hormonal al dezvoltării țesutului aferent sexului. Cuștile trebuie să fie curățate cu grijă pentru a elimina eventualii contaminanți și aranjate astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. Cuștile de dimensiuni adecvate (~ 2 000 cm^2) vor preveni supraaglomerarea.

21. Fiecare animal trebuie să fie identificat individual (de exemplu, prin marcarea sau etichetarea urechii) prin utilizarea unei metode fără suferință. Se consemnează metoda de identificare.

▼M5

22. Hrana de laborator și apa potabilă se furnizează *ad libitum*. Laboratoarele care efectuează biotestul Hershberger trebuie să utilizeze hrană de laborator utilizată în mod normal în activitatea lor de testare a substanțelor chimice. În studiile de validare ale biotestului nu s-au observat efecte sau variabilitate care au fost atribuite hranei. Hrana utilizată va fi notată și un eșantion din hrana de laborator se păstrează în vederea unei eventuale analize ulterioare.

Criterii de performanță pentru valorile greutății organului dependent de androgeni

23. În timpul studiului de validare, nu a existat nicio dovadă că o scădere a greutății corporale a afectat creșterile și scăderile ratei de creștere a greutății țesutului pentru țesuturile țintă (și anume, care trebuie cântărite în cadrul studiului).

24. Printre diferitele sușe de șobolan utilizate cu succes în programul de validare, valorile greutății organelor dependente de androgeni sunt mai mari la sușele de șobolan cu greutate mai mare decât la sușele mai ușoare. Prin urmare, criteriile de performanță ale biotestului Hershberger nu includ valori absolute preconizate ale greutății organelor pentru martori pozitivi și negativi.

25. Deoarece coeficientul de variație (CV) pentru un țesut are o relație inversă cu puterea statistică, criteriile de performanță ale biotestului Hershberger se bazează pe valorile maxime ale CV pentru fiecare țesut (tabelul 1). Valorile CV sunt derivate din studiile de validare ale OCDE. În cazul unor rezultate negative, laboratoarele trebuie să examineze CV de la grupul martor și grupul tratat cu doze ridicate pentru a determina dacă au fost depășite criteriile de performanță maxime ale CV.

26. Studiul se repetă atunci când: 1. trei sau mai multe din cele zece valori CV individuale posibile în grupurile martor și în grupurile tratate cu o doză ridicată depășesc limitele maxime desemnate pentru studiile referitoare la agoniști și antagoniști în tabelul 1; și 2. cel puțin două țesuturi țintă au fost marginal nesemnificative, și anume, cu valori r între 0,05 și 0,10.

Tabelul 1

Valorile CV maxime admisibile stabilite pentru țesuturile sexuale anexe țintă pentru modelul cu animale castrate în studiile de validare ale OCDE ([1])

Țesuturi	Efecte antiandrogenice	Efecte androgenice
Vezicule seminale	40 %	40 %
Prostata ventrală	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Glandele Cowper	35 %	55 %
Glandul penisului	17 %	22 %

([1]) A fost identificată valoarea prag a CV pentru un anumit țesut dintr-un grafic al valorilor CV — aranjate de la cel mai mic la cel mai mare din punct de vedere secvențial — pentru toate mediile obținute din toate experimentele din exercițiul de validare utilizând un model specific (agonist sau antagonist). S-a citit CV-ul prag de la punctul de la care creșterile intermediare până la cele mai ridicate valori ale CV din serie sunt dramatic mai mari decât cele câteva valori ale CV care precedă „punctul critic”. Trebuie menționat că, deși analiza a identificat „puncte critice” relativ fiabile pentru modelul antagonist al testului, curbele CV pentru testul de agonist au prezentat o creștere mai uniformă care a făcut ca identificarea unei valori prag a CV prin această metodă să fie oarecum arbitrară.

▼M5

PROCEDURĂ

Verificarea respectării dispozițiilor de reglementare și de laborator

27. Spre deosebire de testul uterotrofic (capitolul B.54 din prezenta anexă), pentru testul Hershberger nu este necesară o demonstrație a competenței laboratorului înainte de începerea studiului, întrucât se efectuează teste martor concomitent pozitive (propionat de testosteron și flutamidă) și negative ca parte integrantă a testului.

Numărul și starea animalelor

28. Fiecare grup tratat și fiecare grup martor trebuie să includă cel puțin 6 de animale. Această măsură se aplică pentru protocoalele androgenice și antiandrogenice.

Castrarea

29. Trebuie să existe o perioadă de aclimatizare inițială de câteva zile de la primirea animalelor pentru a se asigura că animalele sunt sănătoase și viguroase. Deoarece este posibil ca animalele castrate înainte de vârsta de 42 de zile sau în ziua 42 după fătare (PND 42) să nu prezinte separare prepuțială, animalele se castrează la PND 42 sau ulterior, nu înainte. Animalele sunt castrate sub anestezie prin efectuarea unei incizii la nivelul scrotului și îndepărtarea ambelor testicule și a tuburilor testiculare cu ligaturarea vaselor de sânge și a conductelor seminale. După ce se confirmă că nu există sângerare, scrotul se închide cu sutură sau auto-clipsuri. Animalele se tratează cu analgezice în primele zile după intervenția chirurgicală pentru a atenua orice disconfort postchirurgical. În cazul în care animalele castrate sunt achiziționate de la un furnizor de animale, furnizorul garantează vârsta animalelor și stadiul de maturitate sexuală.

Aclimatizarea după castrare

30. Animalele continuă adaptarea la condițiile de laborator pentru a permite regresarea valorilor greutății țesutului țintă timp de cel puțin 7 zile de la castrare. Animalele se observă zilnic și orice animale care manifestă semne de boală sau anomalii fizice sunt îndepărtate. Prin urmare, tratamentul cu începerea administrării (pe studiu) poate începe cel mai devreme la vârsta PND 49, dar nu mai târziu de PND 60. Vârsta la autopsie nu trebuie să depășească PND 70. Această flexibilitate permite unui laborator să programeze în mod eficient lucrările experimentale.

Greutatea corporală și distribuirea aleatorie a grupurilor

31. Diferențele la nivelul valorilor greutății corporale individuale reprezintă o sursă de variabilitate la nivelul greutății țesutului atât în cadrul unui grup, cât și între grupurile de animale. Variabilitatea tot mai ridicată a greutății țesuturilor conduce la o creștere a coeficientului de variație (CV), reducând forța statistică a testului (numită uneori sensibilitatea testului). Prin urmare, variațiile la nivelul greutății corporale trebuie să fie controlate din punct de vedere experimental și statistic.

32. Controlul experimental presupune producerea de mici variații ale greutății corporale în interiorul unui grup și între grupurile de studiu. În primul rând, se evită animalele neobișnuit de mici sau de mari, acestea nefiind incluse în cohorta de studiu. La începerea studiului, variația de greutate a animalelor utilizate nu trebuie să depășească ± 20 % din greutatea medie (de exemplu, 175 g ± 35 g pentru șobolani peripubertali castrați). În al doilea rând, animalele se distribuie în grupuri (atât martor, cât și tratat) prin distribuție aleatorie a greutății, astfel încât greutatea medie a fiecărui grup să nu fie statistic diferită de cea a oricărui alt grup. Se consemnează procedura de distribuire aleatorie în bloc.

▼M5

33. Deoarece toxicitatea poate diminua greutatea corporală la grupurile tratate în comparație cu grupul martor, se utilizează drept covariabilă statistică greutatea corporală în prima zi de administrare a substanței de testat, și nu greutatea corporală la autopsie.

Dozare

34. Pentru a stabili dacă o substanță chimică de test poate avea efect androgenic *in vivo*, două grupuri tratate cu substanța chimică plus grupuri martor pozitiv și martor pentru vehicul (negativ) (a se vedea punctul 43) sunt în mod normal suficiente, prin urmare, acest concept este preferat din motive de bunăstare a animalelor. În cazul în care scopul este de a obține o curbă doză-răspuns sau pentru a extrapola la doze mai mici, sunt necesare cel puțin 3 grupuri de tratament. În cazul în care sunt necesare mai multe informații în afară de identificarea activității androgenice (precum o estimare a potenței), ar trebui să fie luat în considerare un regim de administrare diferit. Pentru a studia activitatea antiandrogenilor, substanța de testat se administrează împreună cu un agonist androgen de referință. Se utilizează cel puțin 3 grupuri tratate cu diferite doze de substanță de testat, un martor pozitiv și un martor negativ (a se vedea punctul 44). Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor trebuie tratate în mod identic cu animalele din grupurile tratate. Dacă se folosește un vehicul la administrarea substanței de testat, grupul martor trebuie să primească vehiculul în cantitatea cea mai mare utilizată la grupurile tratate.

35. Toate nivelurile de doză se propun și se selectează ținând cont de orice date existente privind toxicitatea și datele (toxico)cinetice disponibile pentru substanța de testat sau materialele asociate. Nivelul cel mai ridicat de doză trebuie, în primul rând, să țină seama de informațiile privind LD_{50} și/sau toxicitatea acută pentru a evita decesul, suferințele grave sau stresarea animalelor (17) (18) (19) (20) și, în al doilea rând, să ia în considerare informațiile disponibile cu privire la dozele utilizate în studiile cronice și subcronice. În general, doza maximă nu ar trebui să determine o reducere în greutatea corporală finală a animalelor mai mare de 10 % din greutatea martor. Doza maximă ar trebui să fie 1. cea mai mare doză care să garanteze supraviețuirea animalelor și care nu provoacă animalelor toxicitate semnificativă sau suferință după 10 zile consecutive de administrare, până la o doză maximă de 1 000 mg/kg/zi (a se vedea punctul 36); sau 2. o doză care induce efecte (anti)androgenice, oricare dintre valori este mai mică. Ca partajare, sunt în general acceptabile intervale mari, de exemplu o semiunitate logaritmică (corespunzătoare unei progresii a dozei de 3,2) sau chiar până la o unitate logaritmică între doze. Dacă nu există informații relevante disponibile, se poate realiza un studiu preliminar pentru stabilirea dozelor (a se vedea punctul 37) pentru a contribui la stabilirea dozelor de utilizat.

Nivelul dozei limită

36. Dacă un test la doza limită de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi și o doză inferioară pe baza metodelor descrise pentru studiu nu produce o schimbare semnificativă din punct de vedere statistic la nivelul valorilor greutății organelor de reproducere, atunci se poate considera că nu sunt necesare niveluri de doze suplimentare. Doza limită se aplică cu excepția cazului în care datele referitoare la expunerea umană indică necesitatea unei doze mai ridicate.

Considerații privind stabilirea nivelurilor dozelor

37. În cazul în care este necesar, se poate efectua un studiu preliminar de stabilire a dozelor pe câteva animale, pentru a selecta nivelurile adecvate de doză [utilizând metode de testare pentru toxicitatea acută [capitolele B.1 bis, B.1 tris din prezenta anexă (27), OT nr. 425 ale OCDE (19)]. Obiectivul în cazul biotestului Hershberger este selectarea de doze care să garanteze supraviețuirea animalelor și care sunt fără toxicitate semnificativă sau suferință pentru animale după zece zile consecutive de administrare a

▼M5

substanței chimice până la doza limită de 1 000 mg/kg/zi, astfel cum s-a specificat la punctele 35 și 36. În acest sens, se poate utiliza un document de orientare al OCDE (17) care definește semnele clinice care indică toxicitate sau suferința animalelor. În cazul în care este posibil în cadrul studiului de stabilire a dozelor, după zece zile de administrare, țesuturile țintă pot fi excizate și cântărite la aproximativ 24 de ore după administrarea ultimei doze. Datele pot fi utilizate ulterior pentru a contribui la selectarea dozelor în cadrul studiului principal.

Substanțele de referință și vehiculul

38. Agonistul androgen de referință este propionatul de testosteron (PT), CAS nr. 57-82-5. Doza de referință de PT poate fi fie 0,2 mg/kg greutate corporală/zi, fie 0,4 mg/kg greutate corporală/zi. Antagonistul androgen de referință este flutamida (FT), CAS nr. 1311-84-7. Doza de referință de FT este de 3 mg/kg greutate corporală/zi, iar FT se coadministrează cu doza PT de referință.

39. Se recomandă ca, acolo unde este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase. Cu toate acestea, deoarece majoritatea liganzilor androgenului sau precursorii lor metabolici tind să fie hidrofobi, cea mai comună abordare este de a utiliza o soluție/suspensie în ulei (de exemplu, ulei de porumb, de arahide, de susan sau de măsline). Substanțele chimice de testat se pot dizolva într-o cantitate minimă de etanol 95 % sau alți solvenți adecvați și pot fi diluate la concentrații de lucru finale în vehiculul testat. Trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale solventului și se testează într-un grup martor separat numai cu solvent. În cazul în care substanța de testat este considerată stabilă, se poate utiliza o încălzire ușoară și acțiune mecanică viguroasă pentru a contribui la dizolvarea substanței de testat. Trebuie să se determine stabilitatea substanței de testat în vehicul. În cazul în care substanța de testat este stabilă pe durata studiului, se poate prepara o alicotă de pornire din substanța de testat, iar diluțiile de dozare specificate se prepară zilnic cu atenție pentru a evita contaminarea sau deteriorarea eșantioanelor.

Administrarea dozelor

40. PT se administrează prin injectare subcutanată, iar FT prin gavaj oral.

41. Substanța de testat se administrează prin gavaj oral sau prin injectare subcutanată. La alegerea căii de administrare, se ține seama de considerente legate de bunăstarea animalelor și de proprietățile fizice/chimice ale substanței de testat. În plus, trebuie luate în considerare aspecte toxicologice, precum relevanța pentru calea de expunere umană la substanța chimică (de exemplu, oral prin gavaj la modelul de ingerare, injectarea subcutanată la modelul de inhalare sau adsorbție cutanată), precum și informațiile toxicologice existente și datele cu privire la metabolism și cinetică (de exemplu, necesitatea de a evita primul pasaj metabolic, o mai bună eficiență prin utilizarea unei anumite căi) înainte de începerea unei testări extinse, pe termen lung, în cazul în care se obțin rezultate pozitive prin injectare.

42. Animalele trebuie tratate în același mod și în aceeași ordine timp de zece zile consecutive la intervale de aproximativ 24 ore. Nivelul de dozare se ajustează zilnic pe baza măsurătorilor zilnice concomitente ale greutății corporale. Volumul dozei și momentul la care se administrează aceasta se notează în fiecare zi de expunere. Trebuie avut grijă să nu se depășească doza maximă specificată la punctul 35, pentru a permite o interpretare semnificativă a datelor. În acest sens, se analizează cu atenție reducerea greutății corporale, semnele clinice, precum și alte constatări. Pentru gavaj

▼M5

oral, se utilizează un tub stomacal sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat odată depinde de dimensiunea animalului de laborator. Trebuie să se urmeze orientările locale privind îngrijirea animalelor, dar volumul nu trebuie să depășească 5 ml/kg masă corporală, cu excepția cazului soluțiilor apoase, în care se pot utiliza 10 ml/kg masă corporală. Pentru injectare subcutanată, dozele se administrează în regiunile dorso-scapulare sau lombare cu un ac steril (de exemplu, cu grosimea 23 sau 25) și o seringă tuberculină. Raderea zonei de injectare este opțională. Se notează eventualele pierderi, scurgeri la punctul de injectare sau administrarea incompletă. Volumul total injectat per șobolan pe zi nu trebuie să depășească 5 ml/kg greutate corporală.

Proceduri specifice pentru agoniștii de androgen

43. Pentru testul privind agoniștii de androgen, vehiculul este martorul negativ și grupul tratat cu PT este martorul pozitiv. Activitatea biologică în concordanță cu agoniștii de androgen este testată prin administrarea unei substanțe de testat la grupurile de tratament în dozele selectate timp de 10 de zile consecutive. Greutățile celor cinci țesuturi sexuale anexe de la grupurile tratate cu substanța de testat sunt comparate cu grupul martor pentru vehicul pentru creșteri în greutate semnificative din punct de vedere statistic.

Proceduri specifice pentru antagoniștii de androgen și inhibitorii de 5α-reductază

44. Pentru testarea privind antagoniștii de androgen și inhibitori de 5α-reductază, grupul tratat este martorul negativ și grupul coadministrat cu doze de referință de PT și FT este martorul pozitiv. Activitatea biologică în concordanță cu antagonişti de androgen și inhibitori de 5areductază este testată prin administrarea unei doze de referință de PT și administrarea substanței de testat timp de 10 zile consecutive. Valorile greutății celor cinci țesuturi sexuale anexe de la grupurile tratate cu substanța de testat plus PT se compară cu cele ale grupului de referință tratat doar cu PT pentru scăderi ale valorilor greutății semnificative din punct de vedere statistic.

OBSERVAȚII

Observații clinice

45. Se recomandă realizarea de observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și chiar mai frecvent în cazul în care se observă semne de toxicitate. Observațiile se efectuează, de preferință, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Toate animalele sunt observate pentru simptome de mortalitate, morbiditate și semne clinice generale, cum ar fi schimbări la nivelul comportamentului, al pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitate reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, dimensiunea pupilei, respirație anormală).

46. Toate animalele găsite moarte se îndepărtează și se elimină fără o analiză suplimentară a datelor. Toate cazurile de mortalitate a animalelor înainte de autopsie se includ în notele studiului, împreună cu orice motive aparente pentru mortalitate. Toate animalele muribunde se eutanasiază. Toate animale muribunde și, ulterior, eutanasiate sunt incluse în notele studiului, împreună cu motivele aparente pentru morbiditate.

▼M5

Greutatea corporală și consumul de hrană

47. Toate animalele se cântăresc zilnic cu o precizie de 0,1 g, începând chiar înainte de inițierea tratamentului, și anume, atunci când animalele sunt distribuite în grupuri. Ca măsurare opțională, se poate cântări cantitatea de alimente consumate per cușcă în perioada tratamentului prin cântărirea alimentatoarelor. Rezultatele consumului alimentar se exprimă în grame pe șobolan pe zi.

Disecția și măsurarea greutății țesuturilor și a organelor

48. La aproximativ 24 de ore după ultima administrare a substanței de testat, șobolanii se eutanasiază și exsanguinează în conformitate cu procedurile normale ale laboratorului executant și se efectuează autopsia. Metoda de eutanasiere se notează în raportul de laborator.

49. În mod ideal, ordinea autopsiei va fi aleatorie între grupuri pentru a evita progresia directă în sus sau în jos în grupurile tratate care ar putea afecta datele. Orice constatare la autopsie, și anume, modificările patologice/leziunile macroscopice, se notează și se raportează.

50. Se cântăresc cele cinci țesuturi dependente de androgeni (PV, VS, LABC, COW, GP). Țesuturile respective sunt excizate, curățate cu grijă de excesul de țesut și grăsime aderent și se determină valorile greutății lor proaspete (nefixat). Fiecare țesut se manipulează cu atenție deosebită pentru a evita pierderea de fluide și pentru a evita deshidratarea, care poate determina erori semnificative și variabilitate prin descreșterea greutății consemnate. Mai multe dintre țesuturi ar putea fi foarte mici sau dificil de disecat, iar acest aspect va introduce variabilitate. Prin urmare, este important ca persoanele care efectuează disecția țesuturilor sexuale anexe să fie familiarizate cu procedurile de disecție standard pentru țesuturile respective. OCDE pune la dispoziție un manual de procedură standard de operare (PSO) pentru disecție (21). Formarea atentă în conformitate cu Ghidul PSO va reduce la minimum o sursă potențială de variație în studiu. În mod ideal, același operator ar trebui să fie responsabil cu disecția unui anumit țesut pentru a elimina diferențele interindividuale de prelucrare a țesutului. În cazul în care acest lucru nu este posibil, autopsia trebuie să fie concepută astfel încât fiecare operator să disece un anumit țesut de la toate grupurile de tratament, spre deosebire de situația în care un individ disecă toate țesuturile prelevate de la un grup martor, în timp ce o altă persoană este responsabilă cu grupurile tratate. Fiecare țesut aferent sexului se cântărește fără a fi tamponat cu o precizie de 0,1 mg și se consemnează greutățile pentru fiecare animal.

51. Mai multe dintre țesuturi ar putea fi foarte mici sau dificil de disecat, iar acest aspect va introduce variabilitate. Activitățile anterioare au indicat o serie de coeficienți de variație (CV), care par să difere în funcție de competența laboratorului. În câteva cazuri, s-au observat diferențe mari la nivelul valorilor absolute ale greutății unor țesuturi precum PV și COW în cadrul unui anumit laborator.

52. Valorile greutății ficatului, a rinichilor pereche și a glandelor suprarenale pereche sunt măsurători opționale. Din nou, țesuturile se curăță de orice urmă de fascia și grăsime. Se cântărește ficatul și se consemnează valoarea cu o precizie de 0,1 g, iar rinichii pereche și glandele suprarenale pereche se cântăresc și se consemnează valorile cu o precizie de 0,1 mg. Ficatul, rinichii și glandele suprarenale nu sunt influențate numai de androgeni; acestea oferă, de asemenea, indicii utile de toxicitate sistemică.

▼**M5**

53. Măsurarea hormonului luteinizant (HL) seric, stimularea hormonului de stimulare foliculară (HSF) și a testosteronului (T) este facultativă. Nivelurile de T seric sunt utile pentru a determina dacă substanța de testat induce metabolismul testosteron în ficat, reducând nivelurile de ser. Fără datele referitoare la T, un astfel de efect ar putea apărea prin intermediul unui mecanism antiandrogenic. Nivelurile de HL oferă informații despre capacitatea unui antiandrogen nu numai de a reduce greutățile organelor, ci și de a afecta funcția hipotalamo-pituitară, ceea ce, în cadrul studiilor pe termen lung, poate cauza tumori testiculare. HSF reprezintă un hormon important pentru spermatogeneză. Nivelurile de T4 și T3 serice sunt, de asemenea, măsurători opționale care ar furniza informații suplimentare cu privire la capacitatea de a perturba homeostaza hormonilor tiroidieni. În cazul în care trebuie să se facă măsurători ale hormonilor, șobolanii sunt anesteziați înainte de autopsie și sângele este prelevat prin puncție cardiacă, iar metoda de anestezie se alege cu grijă astfel încât să nu afecteze măsurarea hormonilor. Se consemnează metoda de pregătire a serului, sursa de radioimunodozare sau alte truse de măsurare, procedurile analitice și rezultatele. Nivelurile de HL se raportează în ng/ml de ser, iar nivelurile de T se raportează, de asemenea, în ng/ml de ser.

54. Disecția țesuturilor este descrisă după cum urmează, un ghid de disecție detaliat cu fotografii publicate ca materiale suplimentare făcând parte din programul de validare (21). O disecție video este, de asemenea, disponibilă pe pagina internet a Agenției Coreene pentru Alimente și Medicamente (Korea Food and Drug Administration) (22).

— Cu suprafața ventrală a animalului în sus, se determină dacă prepuțul penisului s-a separat de glandul penisului. În caz afirmativ, se efectuează retracția prepuțului și se îndepărtează glandul penisului, se cântărește (cu o precizie de 0,1 mg) și se notează greutatea.

— Se deschide pielea și peretele abdominal, expunând viscerele. În cazul în care organele opționale sunt cântărite, se îndepărtează și se cântărește ficatul cu o precizie de 0,1 g, se scot stomacul și intestinele, se scot și se cântăresc rinichii pereche și glandele suprarenale pereche cu o precizie de 0,1 mg. Această disecție expune vezica urinară și începe disecția țesuturilor sexuale anexe țintă.

— Pentru a diseca PV, se separă vezica de mușchiul ventral prin tăierea țesutului conjunctiv de-a lungul liniei mediane. Se deplasează vezica anterior spre veziculele seminale (VS), dezvăluind lobul stâng și lobul drept al prostatei ventrale (acoperiți de un strat de grăsime). Se desprinde cu grijă grăsimea de pe lobul drept și lobul stâng al PV. Se îndepărtează ușor lobul drept al VP de uretră și se taie lobul de la uretră. În timp ce lobul drept al PV se ține în continuare cu mâna, se îndepărtează ușor lobul stâng al PV de uretră și apoi se disecă; se cântărește cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.

— Pentru disecția VSGC, se deplasează vezica urinară caudal, expunând vasele deferente și lobii drept și stâng ai veziculelor seminale plus glande coagulante (VSGC). Se previn scurgerile de fluid prin prinderea unui hemostat la baza VSGC, în cazul în care vasele deferente se îmbină cu uretra. Se disecă cu atenție VSGC, cu hemostat aplicat, se îndepărtează grăsimea și organele anexe, se plasează într-un vas tarat de cântărit, se îndepărtează hemostatul și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg, notându-se greutatea.

▼M5

— Pentru disecția mușchilor *levatori ani plus bulbocavernosus* (LABC), se expun mușchii și baza penisului. Mușchii LA sunt înfășurați în jurul colonului, în timp ce mușchii LA și BC anteriori sunt atașați la bulbii penisului. Se îndepărtează pielea și organele anexe din regiunea perianală care se întind de la baza penisului până la capătul anterior al anusului. Mușchii BC se îndepărtează treptat de bulbul penisului și țesuturi. Colonul este tăiat în două și întregul LABC poate fi disecat și îndepărtat. LABC se curăță de grăsime și de anexe, se cântărește cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.

— După ce s-a îndepărtat LABC, glandele rotunde Cowper sau glandele bulbo-uretrale (COW) sunt vizibile la baza bulbilor penisului și ușor dorsal față de aceștia. Este necesară o disecție atentă pentru a evita crestarea capsulei subțiri, pentru a preveni scurgerea de fluid. Se cântăresc COW pereche cu o precizie de 0,1 mg și se notează greutatea.

— În plus, în cazul în care se pierde fluid din oricare glandă în timpul autopsiei și disecției, aceasta trebuie să fie consemnată.

55. În cazul în care evaluarea fiecărei substanțe chimice necesită autopsia mai multor animale decât este rezonabil pentru o singură zi, începutul studiului poate fi eșalonat pe două zile consecutive, ceea ce conduce la eșalonarea autopsiei și a activităților asociate pe parcursul a două zile. În cazul unei astfel de eșalonări, se utilizează o jumătate din animale per grup de tratament pe zi.

56. Carcasele se elimină în mod corespunzător după autopsie.

RAPORT

Date

57. Datele se raportează individual (și anume, greutatea corporală, greutatea țesuturilor sexuale anexe, măsurători opționale și alte răspunsuri și observații) și pentru fiecare grup de animale (media și deviația standard ale tuturor măsurătorilor efectuate). Acestea se sistematizează în tabele. Datele indică numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte pe parcursul testului sau care au prezentat semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, incluzând momentul apariției, durata și severitatea.

58. Un raport final va include:

Unitatea de testare

— denumirea unității, localizarea;

— directorul studiului și alți membri ai personalului și responsabilitățile acestora în cadrul studiului;

— datele de început și de sfârșit ale studiului, și anume, prima zi de administrare a substanței chimice de testat și, respectiv, ultima zi a autopsiei.

Substanța chimică de testat

— sursa, numărul lotului, identitatea, puritatea, adresa completă a furnizorului și caracterizarea substanței/substanțelor de testat;

— natura fizică și, acolo unde este cazul, proprietățile fizico-chimice;

— condițiile de depozitare și metoda și frecvența pregătirii diluției;

— toate datele obținute cu privire la stabilitate;

— orice analize ale soluțiilor/suspensiilor de dozare.

▼**M5**

Vehicul

— caracterizarea vehiculului (identitate, furnizor și nr. lot);

— justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

Animale de laborator și proceduri de creștere a animalelor

— specia și sușa și justificarea alegerii acestora;

— sursa sau furnizorul de animale, inclusiv adresa completă;

— numărul și vârsta animalelor livrate;

— condițiile de adăpostire (temperatură, iluminat etc.);

— hrana (denumirea, tipul, furnizorul, numărul lotului, conținutul și, dacă se cunosc, nivelurile de fitoestrogen);

— așternut (denumirea, tipul, furnizorul, conținutul);

— condițiile de plasare în cuști și numărul de animale per cușcă.

Condiții de testare

— vârsta la castrare și durata aclimatizării după castrare;

— greutatea fiecărui animal la începutul studiului (cu o precizie de 0,1 g);

— procesul de selecție aleatorie, precum și consemnarea alocării în grupul pentru vehicul, grupul de referință, grupul tratat cu substanța de testat și pe cuști;

— media și deviația standard a valorilor greutății corporale pentru fiecare grup pentru fiecare zi de cântărire pe tot parcursul studiului;

— justificarea alegerii dozei;

— calea de administrare a substanței de testat și justificarea alegerii căii de expunere;

— în cazul unui test de antiandrogenicitate, tratamentul PT (doză și de volum);

— administrarea substanței chimice de testat (doză și volum);

— momentul administrării;

— proceduri de autopsie, inclusiv mijloacele de exsanguinare și orice fel de anestezie;

— în cazul în care se efectuează analize ale serului, se furnizează detalii ale metodei. De exemplu, în cazul în care se utilizează RIA, se raportează procedura RIA, sursa de truse RIA, datele de expirare ale truselor, procedura pentru numărătoarea scintilației și standardizarea.

Rezultate

— observații zilnice pentru fiecare animal în timpul tratamentului, inclusiv:

— greutățile corporale (cu o precizie de 0,1 g);

— semnele clinice (în cazul în care există);

— orice măsurătoare sau note privind consumul alimentar;

— observațiile la autopsie pentru fiecare animal, inclusiv:

▼M5

— data autopsiei;

— grupul animalelor tratate;

— identitatea animalelor;

— operatorul;

— momentul din zi la care s-au efectuat autopsia și disecția;

— vârsta animalelor;

— greutatea corporală finală la autopsie, notând orice creștere sau scădere semnificativă din punct de vedere statistic;

— ordinea exsanguinării și disecției animalelor în momentul autopsiei;

— valorile greutății celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni:

— prostata ventrală (cu o precizie de 0,1 mg);

— veziculele seminale plus glandele coagulante, inclusiv fluidul (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);

— mușchiul complex *levator ani plus bulbocavernosus* (cu o precizie de 0,1 mg);

— glandele Cowper (greutatea în stare proaspătă — pereche, cu o precizie de 0,1 mg);

— glandul penisului (greutatea în stare proaspătă cu o precizie de 0,1 mg);

— valorile greutății țesuturilor opționale, în cazul în care sunt determinate:

— ficat (cu o precizie de 0,1 mg);

— rinichi (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);

— glande suprarenale (pereche, cu o precizie de 0,1 mg);

— observații generale și observații;

— analize ale hormonilor serici, dacă se efectuează astfel de teste:

  — HL seric (opțional — ng/ml de ser); și

  — T seric (opțional — ng/ml de ser);

— observații generale și comentarii.

Rezumatul datelor

Datele se sistematizează în tabele care conțin dimensiunea eșantionului pentru fiecare grup, valoarea medie și eroarea standard a mediei sau deviația standard. Tabelele includ greutatea corporală la autopsie, variații ale greutății corporale de la începutul testului până la autopsie, greutățile țesuturilor sexuale anexe țintă, precum și orice greutăți ale organelor analizate opțional.

Discutarea rezultatelor

Analiza rezultatelor

59. Valorile greutății corporale și a organelor la autopsie se analizează din punct de vedere statistic pentru caracteristici precum omogenitatea variației, cu transformări de date corespunzătoare, după caz. Grupurile de tratament se compară cu un grup martor, utilizând tehnici precum ANOVA, urmată de comparații pe perechi (de exemplu, testul unilateral Dunnett) și criteriul de diferență statistică, de exemplu, $p \leq 0,05$. Se identifică grupurile care ating semnificație statistică. Cu toate acestea, se evită stabilirea greutăților „relative ale organelor” din cauza ipotezelor statistice incorecte care stau la baza unei astfel de manipulări a datelor.

▼**M5**

60. Pentru agonismul androgen, martorul ar trebui să fie grupul tratat doar cu vehicul. Caracteristicile referitoare la modul de acțiune al unei substanțe chimice de testat pot conduce la răspunsuri relative diferite între țesuturi, de exemplu, trenbolon, care nu poate fi redus 5 alfa, are efecte mai pronunțate asupra LABC și GP decât PT. O creștere semnificativă din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$) la nivelul a două sau mai multe din greutățile celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni (PV, LABC, GP, GC și VSGC) se consideră ca fiind un rezultat agonist androgen pozitiv și toate țesuturile țintă ar trebui să manifeste un anumit grad de creștere a dezvoltării. Evaluarea combinată a tuturor răspunsurilor țesuturilor organelor sexuale anexe (OSA) se poate realiza prin analiza adecvată a datelor multivariate. Acest lucru ar putea îmbunătăți analiza, în special în cazurile în care doar un singur țesut oferă un răspuns semnificativ statistic.

61. Pentru antagonismul androgen, martorul ar trebui să fie grupul tratat cu androgenul de referință (numai propionat de testosteron). Caracteristicile referitoare la modul de acțiune al unei substanțe chimice de testat pot conduce la răspunsuri relative diferite între țesuturi, de exemplu, inhibitorii de 5α-reductază, cum ar fi finasterida, au efecte mai pronunțate asupra prostatei ventrale decât asupra altor țesuturi în comparație cu antagoniști puternici RA precum flutamida. O reducere semnificativă din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) la nivelul a două sau mai multe dintre greutățile celor cinci țesuturi țintă dependente de androgeni (PV, LABC, GP, GC și VSGC) asociată tratamentului numai cu PT se consideră un rezultat pozitiv al antagonistului de androgen și toate țesuturile țintă ar trebui să manifeste un anumit grad de reducere a dezvoltării. Evaluarea combinată a tuturor răspunsurilor țesuturilor OSA se poate realiza prin analiza adecvată a datelor multivariate. Acest lucru ar putea îmbunătăți analiza, în special în cazurile în care doar un singur țesut oferă un răspuns semnificativ statistic.

62. Datele se sistematizează în tabele care conțin valoarea medie, eroarea standard a mediei (deviația standard ar fi, de asemenea, acceptabilă) și dimensiunea eșantionului pentru fiecare grup. Se includ, de asemenea, tabele cu date individuale. Se analizează valorile individuale, valorile medii, SE (SD) și CV pentru datele martor pentru a stabili dacă acestea îndeplinesc criterii acceptabile de consecvență cu valorile istorice preconizate. Valorile CV care depășesc valorile CV enumerate în tabelul 1 (a se vedea punctele 25 și 26) pentru greutatea fiecărui organ determină dacă există erori legate de înregistrarea sau introducerea datelor sau dacă laboratorul nu a dobândit încă expertiza pentru disecția țesuturilor dependente de androgeni și se impun cursuri de specializare/practică suplimentare. În general, valorile CV (deviația standard împărțită la greutatea medie a organelor) sunt reproductibile de la un laborator la altul și de la studiu la altul. Datele prezentate vor include cel puțin: greutatea pentru prostata ventrală, veziculele seminale, mușchiul *levator ani plus bulbocavernosus*, glandele Cowper, glandul penisului, ficatul și greutatea corporală, precum și modificarea greutății corporale de la începutul testului până la autopsie. De asemenea, datele pot fi prezentate după ajustarea covarianței pentru greutate corporală, dar aceasta nu înlocuiește prezentarea datelor neajustate. În plus, în cazul în care separarea prepuțială (SPP) nu apare în niciun grup, se consemnează incidența SPP și se compară din punct de vedere statistic cu grupul martor care utilizează testul Fisher Exact.

▼**M5**

63. Atunci când se verifică intrările de date electronice cu fișele de date originale pentru precizie, valorile greutății organelor care nu sunt plauzibile biologic sau variază cu mai mult de trei abateri standard de la mediile grupului de tratament se examinează cu atenție și ar putea fi necesar să fie eliminate, fiind probabil erori de înregistrare.

64. Compararea rezultatelor studiului cu valorile CV ale OCDE (în tabelul 1) reprezintă adesea un pas important în interpretare, în ceea ce privește valabilitatea rezultatelor studiului. Datele istorice pentru grupurile martor se păstrează în laborator. Datele istorice pentru răspunsurile la substanțele de referință pozitive, cum ar fi PT și FT, se păstrează, de asemenea, în laborator. De asemenea, laboratoarele pot să testeze periodic reacția la agoniști și antagoniști androgenici slabi cunoscuți și să păstreze datele. Datele respective pot fi comparate cu datele OCDE disponibile pentru a se asigura că metodele laboratorului furnizează suficientă precizie și putere statistică.

▼**M5**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Androgenic este un termen utilizat pentru a descrie o influență pozitivă asupra creșterii țesuturilor dependente de androgeni.

Antiandrogenic înseamnă capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea PT într-un organism de mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

Data fătării este ziua 0 după fătare.

Doză înseamnă cantitatea de substanță testată administrată. Pentru biotestul Hershberger, doza este exprimată ca greutate de substanță chimică pe unitatea de greutate corporală a animalului de laborator pe zi (de exemplu mg/kg greutate corporală/zi).

Administrarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării.

Muribund este un termen utilizat pentru a descrie un animal pe moarte, adică aproape de deces.

Ziua X după fătare este ziua X de viață după ziua fătării.

Sensibilitate înseamnă capacitatea unei metode de testare de a identifica în mod corect substanțele chimice care au proprietatea pentru care se testează.

Specificitate înseamnă capacitatea unei metode de testare de a identifica în mod corect substanțele chimice care nu au proprietatea pentru care se testează.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

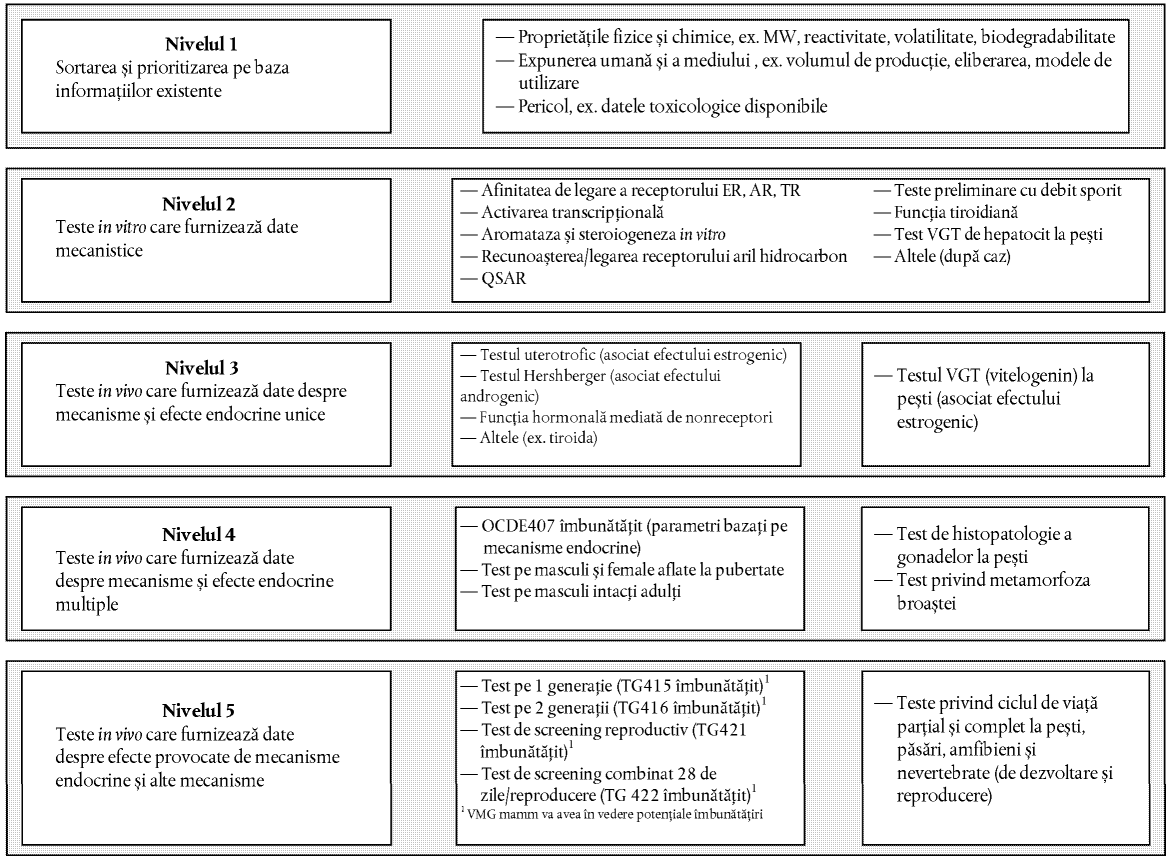
Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

▼M5

Apendicele 2

Notă: Document elaborat de Secretariatul programului privind orientările referitoare la testare pe baza acordului încheiat în cadrul celei de-a 6-a reuniuni a grupului de lucru privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (EDTA)

Cadrul conceptual OCDE privind testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini



VMG mamm: Grupul de gestionare privind validarea testelor și a evaluării la mamifere

02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTE LA CADRU

Nota 1: Intrarea la toate nivelurile și ieșirea la toate nivelurile sunt posibile și depind de natura necesităților de informații existente în scopul evaluării riscurilor și a pericolelor.

Nota 2: La nivelul 5, ecotoxicologia trebuie să includă parametri care să indice mecanisme de efecte adverse și eventuala vătămare a populației.

Nota 3: În cazul în care un model multimodal acoperă mai multe teste cu parametru unic, modelul respectiv ar înlocui utilizarea testelor cu parametru unic în cauză.

Nota 4: Evaluarea fiecărei substanțe chimice se efectuează de la caz la caz, ținând cont de toate informațiile disponibile, având în vedere funcția nivelurilor cadrului.

Nota 5: Nu trebuie să se considere că în prezent cadrul include toate testele. La nivelurile 3, 4 și 5 acesta include teste care sunt disponibile sau care sunt în curs de validare. Acestea din urmă sunt incluse cu titlu provizoriu. După dezvoltarea și validarea lor, acestea vor fi adăugate în mod oficial în cadru.

Nota 6: Nu trebuie să se considere că nivelul 5 include doar teste definitive. Se consideră că testele incluse la acest nivel contribuie la evaluarea generală a riscurilor și a pericolelor.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19nor-testosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p. 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 926412367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: Disponibil la: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. Disponibil la: http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice (JO L 276, 20.10.2010, p. 33).

(27) Următoarele capitole din prezenta anexă:

B.1 bis, Toxicitate orală acută — procedura cu doză fixă

B.1 tris, Toxicitate orală acută — metoda clasei toxice acute.

▼M5

B.56. STUDIU EXTINS DE TOXICITATE ASUPRA REPRODUCERII PE O GENERAȚIE

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 443 (2012). Metoda se bazează pe propunerea comitetului tehnic International Life Science Institute (ILSI) — Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) privind un studiu extins de reproducere efectuat pe o generație în etapa de viață F_1, publicată în Cooper et al., 2006 (1). S-au realizat mai multe îmbunătățiri și clarificări ale conceptului studiului pentru a-i oferi flexibilitate și pentru a sublinia importanța de a porni de la cunoștințele existente, utilizând în același timp observații în-viață pentru a ghida și a adapta testarea. Prezenta metodă de testare oferă o descriere detaliată a desfășurării operaționale a unui studiu extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. Metoda de testare descrie trei cohorte de animale F_1:

cohorta 1: evaluează parametrii de reproducere/dezvoltare; cohorta se poate extinde pentru a include o generație F_2;

cohorta 2: evaluează impactul potențial al expunerii la substanțe chimice asupra sistemului nervos în curs de dezvoltare;

cohorta 3: evaluează impactul potențial al expunerii la substanțe chimice asupra sistemului imunitar în curs de dezvoltare.

2. Deciziile referitoare la evaluarea celei de a doua generații și la omiterea cohortei privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare și/sau a cohortei privind imunotoxicitatea pentru dezvoltare trebuie să reflecte cunoștințele existente referitoare la substanța chimică evaluată, precum și nevoile specifice ale diferitelor autorități de reglementare. Scopul metodei de testare este de a furniza detalii cu privire la modul în care se poate efectua studiul și de a aborda modul în care trebuie să fie evaluată fiecare cohortă.

3. Procedura privind decizia de declanșare internă pentru producerea unei a doua generații este descrisă în documentul de orientare al OCDE nr. 117 (39) pentru autoritățile de reglementare care utilizează declanșatori interni.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI OBIECTIVE

4. Obiectivul principal al studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație este de a evalua anumite etape ale ciclului de viață care nu sunt incluse în alte tipuri de studii de toxicitate și de a analiza efectele care pot apărea ca urmare a expunerii pre- și postnatale la o substanță chimică. Pentru obiective de reproducere, se are în vedere faptul că, atunci când sunt disponibile și ca un prim pas, informațiile din studii cu doze repetate [inclusiv studii de depistare a toxicității pentru reproducere, de exemplu OT nr. 422 ale OCDE (32)] sau teste pe termen scurt de depistare a perturbatorilor endocrini [de exemplu, testul uterotrofic — metoda de testare B.54 (36); și testul Hershberger — metoda de testare B.55 (37)] sunt utilizate pentru a detecta efectele asupra organelor de reproducere la masculi și femele. Acestea ar putea include spermatogeneza (histopatologie testiculară) pentru masculi, precum și ciclurile estrale, numărarea foliculilor/maturizarea ovocitelor și integritatea ovariană (histopatologie) pentru femele. Studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație servește, în acest caz, ca un test pentru obiective de reproducere care necesită interacțiunea masculilor cu femele, femele gestante, precum și femele cu pui și generația F_1 până la maturizarea sexuală [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE care sprijină prezenta metodă de testare (40)].

▼**M5**

5. Metoda de testare este concepută să furnizeze o evaluare a efectelor pre- și postnatale ale substanțelor chimice asupra dezvoltării, precum și o evaluare aprofundată a toxicității sistemice la femelele gestante și femelele în lactație și la puii tineri și adulți. Se preconizează că examinarea detaliată a principalilor parametri pentru dezvoltare, cum ar fi viabilitatea puilor, sănătatea neonatală, statutul de dezvoltare la naștere, dezvoltarea fizică și funcțională până la vârsta adultă, va identifica organe țintă specifice la pui. În plus, studiul va oferi și/sau confirma informațiile cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin la adulți. În mod special, dar nu exclusiv, se analizează parametrii următori: funcția gonadică, ciclul estral, maturarea spermei epididimale, comportamentul de împerechere, concepția, sarcina, nașterea și alăptarea. În plus, informațiile obținute din evaluările privind neurotoxicitatea pentru dezvoltare și din evaluările privind imunotoxicitatea pentru dezvoltare vor caracteriza efectele potențiale asupra sistemelor respective. Datele rezultate din teste vor permite determinarea dozei la care nu s-a observat nicio reacție adversă (No-Observed Adverse Effect Levels, NOAEL), nivelul cel mai scăzut pentru care este observat un efect advers (Lowest Observed Adverse Effect Levels, LOAEL) și/sau dozele de referință pentru diferiți parametri și/sau utilizate pentru caracterizarea efectelor constatate în studii anterioare cu doze repetate și/sau ca ghid pentru testări ulterioare.

6. O schemă a protocolului este prezentată în figura 1. Substanța de testat se administrează în mod continuu, în doze crescătoare, mai multor grupuri de femele și masculi maturi din punct de vedere sexual. Generația parentală (P) este tratată pentru o perioadă de timp definită înainte de împerechere (selectată pe baza informațiilor disponibile pentru substanța de testat, dar timp de cel puțin două săptămâni) și o perioadă de două săptămâni de împerechere. Masculii P sunt tratați în continuare cel puțin până la înțărcarea F_1. Aceștia ar trebui tratați timp de cel puțin 10 săptămâni. Masculii pot fi tratați o perioadă mai lungă de timp dacă este necesar să se clarifice efectele asupra reproducerii. Tratamentul femelelor P este continuat în timpul sarcinii și al alăptării până la sacrificare după înțărcarea puilor lor (și anume, 8-10 săptămâni de tratament). Puii F_1 sunt tratați în continuare cu substanța de testat de la înțărcare până la vârsta adultă. Dacă este evaluată o a doua generație [a se vedea documentul de orientare nr. 117 al OCDE (39)], puii F_1 sunt menținuți sub tratament până la înțărcarea F_2 sau până la sacrificare.

7. Se efectuează observații clinice și examinări patologice asupra tuturor animalelor în vederea notării simptomelor de toxicitate, cu un accent special asupra integrității și funcționării sistemelor de reproducere masculin și feminin și asupra sănătății, creșterii, dezvoltării și funcționării puilor. După înțărcare, puii selectați se distribuie în cohorte specifice (cohortele 1-3, a se vedea punctele 33 și 34 și figura 1) pentru mai multe investigații, inclusiv maturizarea sexuală, integritatea și funcția organelor de reproducere, parametrii neurologici și comportamentali și funcțiile imunitare.

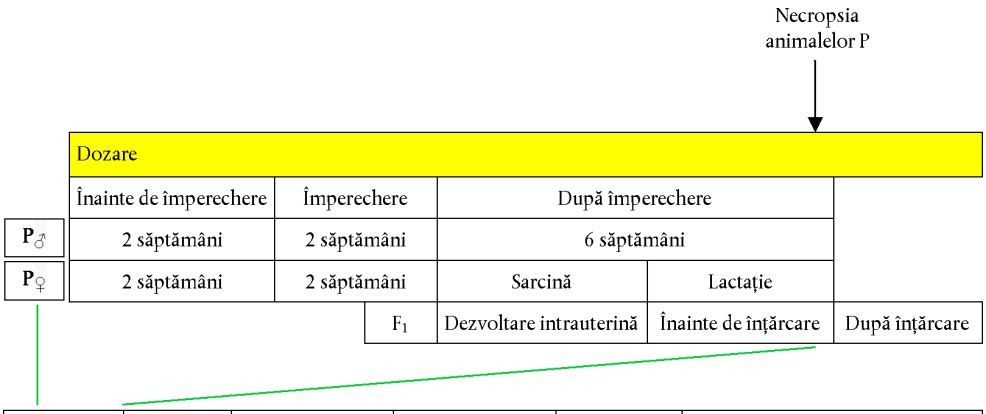
8. În desfășurarea studiului, se respectă principiile directoare și considerentele descrise în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca parametri fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (34).

▼M5

9. Atunci când va fi disponibil un număr suficient de studii pentru a determina impactul noului concept de studiu, metoda de testare va fi examinată și, în cazul în care este necesar, revizuită, având în vedere experiența acumulată.

Figura 1

Schemă a studiului extins de toxicitate asupra reproducerii pe o generație



Generația parentală	Cohortă	Denumire	Animale/cohortă	Maturizare sexuală	Vârsta aproximativă la necropsie (săptămâni)
Obiectiv de 20 de pui per grup	1A	Reproductiv	20 M + 20 F	Da	13
	1B	Reproductiv	20 M + 20 F	Da	14 sau 20-25, dacă se declanșează
	2A	Neurotoxicitate	10 M + 10 F @	Da	11-12
	2B	Neurotoxicitate	10 M + 10 F @	Nu	3
	3	Imunotoxicitate	10 M + 10 F @	Da	8
	Excedent	Rezerve		Nu	3

@ unul per cuib și reprezentativ pentru 20 de cuiburi în total, dacă este posibil

DESCRIEREA METODEI/PREPARATE PENTRU TEST

Animale

Selectarea speciei și sușei de animale

10. Alegerea speciei pentru testul de toxicitate pentru reproducere se analizează cu atenție, ținând seama de toate informațiile disponibile. Cu toate acestea, din cauza amplorii informațiilor contextuale și a comparabilității testelor de toxicitate generală, în mod normal, specia preferată este șobolanul, iar criteriile și recomandările formulate în prezenta metodă de testare se referă la această specie. Dacă se utilizează altă specie, se va oferi o justificare și trebuie să se efectueze modificări corespunzătoare ale protocolului. Nu se utilizează sușe cu fertilitate scăzută sau cu o incidență ridicată bine-cunoscută a defectelor spontane de dezvoltare.

Vârsta, greutatea corporală și criteriile de includere

11. Se utilizează animale parentale sănătoase, care nu au fost supuse anterior altor proceduri de testare. Se studiază atât masculi, cât și femele, iar femelele trebuie să fie nulipare și negestante. Animalele P trebuie să fie la maturitate sexuală, de aceeași greutate (în cadrul aceluiași sex) la începerea administrării, de vârstă similară (aproximativ 90 de zile) la împerechere și reprezentative pentru specia și sușa studiată. Animalele se aclimatizează timp de cel puțin 5 zile de la sosire. Animalele sunt atribuite în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament, într-un mod care conduce la valori medii comparabile ale greutății corporale între grupuri (și anume, ± 20 % din valoarea medie).

▼M5

Condiții de adăpostire și de hrănire

12. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C). Se asigură o umiditate relativă între 30-70 %, cu un interval ideal de 50-60 %. Se stabilește iluminare artificială cu 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu o sursă nelimitată de apă potabilă. Se acordă o atenție deosebită conținutului de fitoestrogen al hranei, întrucât un nivel ridicat de fitoestrogen în hrană ar putea afecta anumiți parametri de reproducere. Se recomandă hrană standardizată, cu formulă deschisă în care au fost reduse substanțele chimice estrogenice (2) (30). Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe de testat atunci când aceasta se administrează utilizând metoda de administrare prin hrană. Se verifică conținutul, omogenitatea și stabilitatea substanței de testat din hrană. Hrana și apa potabilă se analizează în mod regulat pentru detectarea contaminanților. Se păstrează probe din fiecare lot de hrană utilizat în timpul studiului în condiții adecvate (de exemplu, congelate la – 20 °C), până la finalizarea raportului, pentru eventualitatea în care rezultatele necesită o analiză suplimentară a ingredientelor hranei.

13. Animalele se plasează în cuști în grupuri mici de același sex și din același grup de tratament. Acestea pot fi adăpostite individual pentru a evita posibilele accidente (de exemplu, masculii după perioada de împerechere). Procedurile de împerechere se efectuează în cuști adecvate. După constatarea copulației, femelele presupuse a fi gestante sunt adăpostite separat în cuști pentru fătare sau maternitate în care li se oferă materiale definite și adecvate pentru cuiburi. Puii sunt adăpostiți cu mamele lor până la înțărcare. Animalele F_1 se adăpostesc în grupuri mici de același sex și din același grup de tratament de la înțărcare până la sacrificare. În cazul în care se justifică din punct de vedere științific, animalele pot fi adăpostite individual. Nivelul de fitoestrogeni conținut în materialul de așternut selectat trebuie să fie minim.

Numărul și identificarea animalelor

14. În mod normal, fiecare grup tratat și grup martor trebuie să conțină un număr suficient de perechi de împerechere pentru a obține cel puțin 20 de femele gestante în fiecare grup de doză. Obiectivul este producerea unui număr suficient de sarcini pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern al generației P, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F_1, de la concepție până la maturitate. Dacă nu se obține numărul dorit de animale gestante, aceasta nu implică în mod necesar invalidarea studiului și situația se evaluează de la caz la caz, luând în considerare o posibilă relație cauzală cu substanța de testat.

15. Fiecărui animal P i se atribuie un număr unic de identificare înainte de începerea tratamentului. Dacă datele istorice de laborator sugerează că o proporție semnificativă de femele ar putea să nu aibă cicluri estrale regulate (de 4 sau 5 zile), atunci se recomandă o evaluare a ciclurilor estrale înainte de începerea tratamentului. În mod alternativ, se poate mări dimensiunea grupului pentru a asigura faptul că cel puțin 20 de femele din fiecare grup ar avea cicluri estrale regulate (de 4 sau 5 zile) la începutul tratamentului. Toți puii F_1 sunt identificați în mod unic atunci când sunt nou-născuți și sunt examinați în ziua 0 sau 1 după fătare (PND). Se păstrează înregistrări privind originea cuibului pentru toate animalele F_1 și animalele F_2, după caz, pe tot parcursul studiului.

▼M5

Substanța chimică de testat

Informațiile disponibile cu privire la substanța chimică de testat

16. Revizuirea informațiilor existente este importantă pentru deciziile cu privire la calea de administrare, alegerea vehiculului, selectarea speciei de animale, selectarea dozelor și eventualele modificări ale schemei de tratament. Prin urmare, toate informațiile disponibile relevante privind substanța de testat, și anume, proprietățile fizico-chimice, toxicocinetice (inclusiv metabolismul specific speciei), toxicodinamice, relațiile structură-activitate (RSA), procesele metabolice *in vitro*, rezultatele studiilor de toxicitate anterioare și informațiile relevante pe analogii structurali trebuie luate în considerare în planificarea studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. Se pot obține informații preliminare privind absorbția, distribuția, metabolismul și eliminarea (ADME) și bioacumularea din structura substanței chimice, datele fizico-chimice, dimensiunea legăturii proteinei plasmatice și studiile toxicocinetice (TK), în timp ce rezultatele studiilor de toxicitate oferă informații suplimentare, de exemplu, privind NOAEL, metabolismul sau inducerea metabolismului.

Luarea în considerare a datelor toxicocinetice

17. Deși nu sunt necesare, datele TK de la studiile efectuate anterior pentru stabilirea dozelor sau alte studii sunt extrem de utile pentru planificarea conceptului de studiu, selecția nivelurilor de doze și interpretarea rezultatelor. Deosebit de utile sunt datele care: 1. verifică expunerea fetușilor și a puilor în curs de dezvoltare la substanța de testat (sau la metaboliți relevanți); 2. oferă o estimare a dozimetriei interne; și 3. evaluează potențiala saturație dependentă de doză a proceselor cinetice. De asemenea, se iau în considerare date suplimentare TK, cum ar fi profiluri de metabolit, cursuri concentrație-timp etc., dacă sunt disponibile. În timpul studiului principal, se pot colecta, de asemenea, date suplimentare TK, cu condiția ca aceasta să nu interfereze cu colectarea și interpretarea principalilor parametri de studiu.

Ca un ghid general, următoarele date TK ar fi utile în planificarea studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație:

— în ultima parte a sarcinii (de exemplu, a 20-a zi de gestație) — sânge matern și sânge fetal;

— la jumătatea perioadei de lactație (PND 10) — sânge matern, sânge de la pui și/sau lapte;

— la începutul perioadei după înțărcare (de exemplu PND 28) — probe de sânge de la puii înțărcați.

Se păstrează flexibilitatea în determinarea analiților specifici (de exemplu, substanța chimică de bază și/sau metaboliți) și a schemei de eșantionare. De exemplu, numărul și calendarul de colectare a probelor într-o zi de eșantionare dată va depinde de calea de expunere și de cunoștințele anterioare privind proprietățile TK la animalele negestante. Pentru studii privind hrana, este suficientă prelevarea de probe la un singur moment din zi consecvent pentru fiecare dintre zilele de eșantionare, în timp ce administrarea prin gavaj poate impune repetări suplimentare ale prelevării de probe pentru a obține o mai bună estimare a intervalului de doze interne. Cu toate acestea, nu este necesar să se obțină concentrații în timp-curs complete în fiecare dintre zilele de eșantionare. Dacă este necesar, se colectează la comun probe de sânge în funcție de sex în cadrul cuiburilor pentru analize fetale și neonatale.

▼M5

Calea de administrare

18. Selectarea căii de administrare trebuie să ia în considerare calea (căile) cea (cele) mai relevantă (relevante) pentru expunerea umană. Cu toate că protocolul este conceput pentru administrarea substanței de testat prin hrană, acesta poate fi modificat pentru administrare pe alte căi (apă potabilă, gavaj, inhalare, cutanată), în funcție de caracteristicile substanței chimice și informațiile necesare.

Alegerea vehiculului

19. Dacă este necesar, substanța de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, atunci când este posibil, să se utilizeze de preferat o soluție/suspensie apoasă, urmată de luarea în considerare a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb). Pentru vehicule altele decât apa, trebuie să se cunoască caracteristicile toxice ale vehiculului. Trebuie evitată utilizarea vehiculelor cu potențial de toxicitate intrinsecă (de exemplu, acetonă, DMSO). Se determină stabilitatea substanței de testat în vehicul. Se iau în considerare următoarele caracteristici, în cazul în care se utilizează un vehicul sau alt aditiv pentru a facilita administrarea: efectele asupra absorbției, distribuției, metabolismului sau reținerii în organism a substanței de testat; efectele asupra proprietăților chimice ale substanței de testat care pot modifica caracteristicile sale toxice; și efectele asupra consumului de hrană sau de apă sau asupra stării de nutriție a animalelor.

Selectarea dozei

20. În mod normal, studiul trebuie să includă cel puțin trei niveluri de doză și un martor concomitent. La selectarea nivelurilor adecvate de doză, experimentatorul trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile, inclusiv informații de dozare din studii anterioare, date TK de la animalele gestante sau negestante, gradul de transfer de lactație și estimările expunerii umane. Dacă sunt disponibile date TK care indică o saturație dependentă de doză a proceselor TK, trebuie avut grijă să se evite niveluri ridicate de doze, care manifestă în mod clar saturație, bineînțeles, dacă se preconizează că expunerile umane vor fi mult sub punctul de saturație. În astfel de cazuri, cel mai înalt nivel de doză trebuie să fie la, sau doar puțin peste, punctul de inflexiune pentru trecerea la un comportament TK neliniar.

21. În absența datelor TK relevante, nivelurile dozelor se bazează pe efectele toxice, cu excepția cazului în care acestea sunt limitate de natura fizică/chimică a substanței de testat. Dacă nivelurile dozelor se bazează pe toxicitate, se alege doza maximă cu scopul de a induce o anumită toxicitate sistemică, dar nu decesul sau suferința profundă a animalelor.

22. Se selectează o secvență descrescătoare de doze pentru a demonstra existența oricărui efect asociat dozei și pentru a stabili NOAEL sau dozele aproape de limita de detectare care ar permite obținerea unei doze de referință pentru parametrul (parametrii) cel (cei) mai sensibil(i). Pentru a evita o distanțare mare a dozelor între NOAEL și LOAEL, intervalul optim este un factor de 2 sau 4. Deseori este preferabil să se adauge un al patrulea grup de tratament, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare decât 10) între doze.

23. Cu excepția tratamentului cu substanța de testat, animalele din grupul martor sunt tratate în mod identic cu subiecții din grupul de tratament. Grupul martor este netratat sau tratat cu placebo sau este un grup martor pentru vehicul în cazul în care se utilizează un vehicul în administrarea substanței de testat. În cazul în care se folosește un vehicul, grupul martor primește cel mai mare volum utilizat de vehicul.

▼M5

Testul-limită

24. Dacă nu există semne de toxicitate la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi în studiile cu doză repetată sau dacă se preconizează toxicitate pe baza datelor de la substanțe chimice înrudite din punct de vedere structural și/sau metabolic indicând o similitudine a proprietăților metabolice *in vivo*/*in vitro*, ar putea să nu fie necesar un studiu care utilizează mai multe doze. În astfel de cazuri, studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație se poate realiza utilizând un grup martor și o singură doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Cu toate acestea, în cazul în care se constată existența unor semne de toxicitate pentru reproducere sau pentru dezvoltare la doza limită, sunt necesare studii suplimentare, la doze mai mici, pentru a identifica NOAEL. Aceste considerente privind testul-limită se aplică numai atunci când expunerea umană nu impune utilizarea unei doze mai mari.

PROCEDURI

Expunerea puilor

25. Expunerea alimentară este metoda de administrare preferată. Dacă se efectuează studii prin gavaj, trebuie remarcat faptul că puii vor primi în mod normal substanța de testat numai în mod indirect, prin lapte, până se începe tratarea directă a acestora la înțărcare. În studiile realizate cu administrare prin intermediul hranei sau al apei potabile, puii vor primi în plus substanța de testat direct atunci când încep să mănânce singuri în ultima săptămână a perioadei de alăptare. Trebuie să se ia în considerare efectuarea unor modificări privind conceptul studiului atunci când excreția substanței de testat în lapte este slabă și în cazul în care nu se dovedește o expunere continuă a puilor. În astfel de cazuri, se ia în considerare tratarea directă a puilor în timpul perioadei de alăptare pe baza informațiilor TK disponibile, a toxicității la nivelul puilor sau a modificărilor la nivelul biomarkerilor (3) (4). Înainte de efectuarea unor studii de dozare directă asupra puilor care alăptează, ar trebui să se realizeze o analiză atentă a beneficiilor și a dezavantajelor (5).

Programul de administrare și administrarea dozelor

26. Unele informații cu privire la ciclurile estrale, histopatologia tractului reproducător masculin și feminin și analiza spermei testiculare/epididimale pot fi disponibile din studii anterioare de toxicitate cu doze repetate având o durată corespunzătoare. Prin urmare, durata tratamentului înainte de împerechere în cadrul studiului extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație are drept scop depistarea efectelor asupra modificărilor funcționale care pot interfera cu comportamentul de împerechere și cu fertilizarea. Tratamentul înainte de împerechere trebuie să fie suficient de îndelungat pentru a obține condiții de expunere la o stare de echilibru la femele și masculi P. Un tratament de 2 săptămâni înainte de împerechere pentru ambele sexe este considerat suficient în majoritatea cazurilor. La femele, aceasta înseamnă 3-4 cicluri estrale complete și ar trebui să fie suficient pentru a detecta eventualele efecte adverse asupra ciclicității. La masculi, aceasta echivalează cu timpul necesar pentru tranzitul epididimal al spermatozoizilor în curs de maturizare și ar trebui să permită detectarea efectelor posttesticulare asupra spermei (în timpul etapelor finale ale generării spermei și al maturizării spermei epididimale) la împerechere. La momentul finalizării studiului, când sunt programate histopatologia testiculară și epididimală și analiza parametrilor spermei, masculii P și F_1 vor fi fost expuși timp de cel puțin un întreg proces de spermatogeneză [(6) (7) (8) (9), a se vedea, de asemenea, documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)].

▼M5

27. Scenariile de expunere a masculilor înainte de împerechere pot fi adaptate, în cazul în care în studiile anterioare s-a constatat în mod clar toxicitate testiculară (afectarea spermatogenezei) sau efecte asupra integrității și funcției spermei. În mod similar, la femele, efectele cunoscute ale substanței de testat asupra ciclului estral și, prin urmare, asupra receptivității sexuale pot justifica diferite scenarii de expunere înainte de împerechere. În cazuri speciale, poate fi acceptabil ca tratarea femelelor P să fie inițiată numai după obținerea unui frotiu de spermă pozitiv [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)].

28. Odată stabilită perioada de tratare înainte de împerechere, animalele se tratează cu substanța de testat continuu timp de 7 zile/săptămână până la autopsie. Toate animalele se tratează utilizând aceeași metodă. Administrarea este continuată în timpul perioadei de împerechere de 2 săptămâni și, la femelele P, pe parcursul gestației și alăptării până în ziua încheierii studiului după înțărcare. Masculii se tratează în același mod până la sacrificare, atunci când animalele F_1 sunt înțărcate. Pentru autopsie, se acordă prioritate femelelor, care se autopsiază în aceeași zi/ziua similară de lactație. Autopsia masculilor se poate desfășura pe parcursul unui număr mai mare de zile, în funcție de dotările laboratorului. Cu excepția cazului în care este deja inițiată în timpul perioadei de alăptare, administrarea directă la masculi și la femelele selectate F_1 ar trebui să înceapă la înțărcare și să continue până la momentul autopsiei programate, în funcție de alocarea în cohortă.

29. Pentru substanțele chimice administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță de testat implicate nu interferează cu nutriția normală sau cu echilibrul hidric. Atunci când substanța de testat se administrează prin intermediul hranei, se utilizează fie o concentrație dietetică constantă (ppm), fie o doză constantă în funcție de greutatea corporală a animalului; se specifică opțiunea aleasă.

30. Atunci când substanța de testat se administrează prin gavaj, volumul de lichid administrat la un moment dat nu ar trebui să depășească, în mod normal, 1 ml/100 g greutate corporală (0,4 ml/100 g greutate corporală este maximul pentru ulei, de exemplu ulei de porumb). Cu excepția substanțelor chimice iritante sau corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai ridicate, variația volumului testat se reduce la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant pentru toate dozele. Tratamentul se administrează aproximativ la aceeași oră în fiecare zi. Doza administrată fiecărui animal se bazează în mod normal pe cea mai recentă determinare a greutății corporale individuale și se ajustează cel puțin săptămânal la masculii adulți și femelele adulte negestante și la fiecare două zile la femelele gestante și animalele F_1 atunci când se administrează înainte de înțărcare și în timpul celor 2 săptămâni după înțărcare. Dacă datele TK indică un transfer placentar scăzut al substanței de testat, doza de gavaj în ultima săptămână de gestație ar putea necesita o ajustare pentru a preveni administrarea unei doze excesiv de toxice femelei gestante. În ziua fătării, femelele nu trebuie tratate prin gavaj sau oricare altă cale de tratament în care animalul trebuie să fie manipulat; omiterea administrării substanței de testat în ziua respectivă este de preferat unei tulburări a procesului de fătare.

▼M5

Împerechere

31. Fiecare femelă P se plasează cu un singur mascul neconsangvin selectat aleatoriu din același grup de doză (cuplare 1:1), până când se observă semne de copulație sau au trecut două săptămâni. În cazul în care nu există un număr suficient de masculi, de exemplu, ca urmare a decesului masculului înainte de împerechere, atunci masculul/masculii care s-au împerecheat se poate/pot cupla (1:1) cu o a doua femelă/femele, astfel încât toate femelele să fie cuplate. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se găsește un dop vaginal sau spermă). Animalele se separă cât mai curând posibil după ce se observă dovada copulației. În cazul în care împerecherea nu a avut loc după 2 săptămâni, animalele se separă fără o altă posibilitate de împerechere. Cuplurile împerecheate trebuie identificate în mod clar în date.

Dimensiunea cuibului

32. În ziua 4 după fătare, se poate ajusta dimensiunea fiecărui cuib prin eliminarea puilor în plus prin selecție aleatoare pentru a se obține, pe cât posibil, cinci masculi și cinci femele per cuib. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale, nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de cinci exemplare din fiecare sex per cuib, este acceptabilă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele).

Selecția puilor pentru studii după înțărcare (a se vedea figura 1)

33. La înțărcare (în jur de PND 21), se selectează puii din toate cuiburile disponibile până la 20 per doză și grupul martor pentru examinări suplimentare și se păstrează până la maturizare sexuală (dacă nu este necesară testarea mai devreme). Puii sunt selectați aleatoriu, fără a include exemplarele evident mai mici decât normal (animale cu o greutate corporală cu mai mult de două deviații standard sub greutatea medie a puilor din cuibul respectiv), deoarece este puțin probabil ca acestea să fie reprezentative pentru grupul de tratament.

La PND 21, puii F_1 selectați sunt repartizați aleatoriu în una dintre cele trei cohorte de animale, după cum urmează:

cohorta 1 (1A și 1B) = teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare;

cohorta 2 (2A și 2B) = teste de neurotoxicitate pentru dezvoltare;

cohorta 3 = teste de imunotoxicitate pentru dezvoltare.

Cohorta 1A: un mascul și o femelă/cuib/grup (20/sex/grup): selecție prioritară pentru evaluarea primară a efectelor asupra sistemelor de reproducere și a toxicității generale.

Cohorta 1B: un mascul și o femelă/cuib/grup (20/sex/grup): selecție prioritară pentru evaluarea de urmărire a performanței de reproducere prin împerecherea animalelor F_1, atunci când este evaluată [a se vedea documentul de orientare nr. 117 al OCDE (39)] și pentru obținerea de date histopatologice suplimentare în cazuri de substanțe toxice cu efecte asupra reproducerii sau asupra glandelor endocrine sau atunci când rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare.

Cohorta 2A: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; 1 mascul sau 1 femelă per cuib) alocați pentru testare neurocomportamentală, urmată de evaluare neurohistopatologică ca adulți.

Cohorta 2B: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; 1 mascul sau 1 femelă per cuib) alocați pentru evaluare neurohistopatologică la înțărcare (PND 21 sau PND 22). În cazul în care nu există un număr suficient de animale, se acordă prioritate alocării animalelor în cohorta 2A.

▼M5

Cohorta 3: un total de 20 de pui per grup (10 masculi și 10 femele pentru fiecare grup; unul per cuib, acolo unde este posibil). Se pot solicita pui suplimentari de la grupul martor pentru a acționa ca animale martor pozitiv în testul de răspuns al anticorpilor dependent de celulele T (TDAR) la PND 56 ± 3.

34. Dacă nu există un număr suficient de pui într-un cuib pentru a servi toate cohortele, cohorta 1 are prioritate, întrucât aceasta poate fi extinsă pentru a produce o generație F_2. Se pot repartiza pui suplimentari în oricare dintre cohorte în caz de interes specific, de exemplu, în cazul unei substanțe suspectate de efecte neurotoxice, imunotoxice sau toxice pentru reproducere. Puii respectivi se pot utiliza pentru examinări la diferite momente în timp sau pentru evaluarea unor parametri suplimentari. Puii care nu au fost atribuiți în cohorte vor fi supuși la biochimie clinică (punctul 55) și autopsie macroscopică (punctul 68).

A doua împerechere a animalelor P

35. În mod normal, nu se recomandă o a doua împerechere a animalelor P, deoarece aceasta implică pierderea unor informații importante cu privire la numărul de locuri de implantare (și, astfel, se pierd date postimplantare și date privind pierderile perinatale, indicatori ai unui posibil potențial teratogen) pentru primul cuib. Necesitatea de a verifica sau de a elucida un efect la femelele expuse ar fi satisfăcută mai bine prin extinderea studiului pentru a include o împerechere a generației F_1. Cu toate acestea, o a doua împerechere a masculilor P cu femele netratate este întotdeauna o opțiune disponibilă pentru a clarifica concluziile neclare sau pentru o caracterizare suplimentară a efectelor asupra fertilității observate la prima împerechere.

OBSERVAȚII ÎN-VIAȚĂ

Observații clinice

36. Pentru animalele P și animalele selectate F_1, o observație clinică generală se realizează o dată pe zi. În cazul administrării prin gavaj, momentul observației clinice trebuie să fie înainte și după administrare (pentru a observa eventuale semne de toxicitate asociate cu concentrația plasmatică maximă). Se consemnează modificările comportamentale pertinente, semnele de fătare dificilă sau prelungită și orice semne de toxicitate. De două ori pe zi, iar în timpul weekend-ului o dată pe zi, se observă toate animalele pentru semne de toxicitate severă, morbiditate și mortalitate.

37. În plus, săptămânal se efectuează o examinare mai atentă a tuturor animalelor P și F_1 (după înțărcare), aceasta putând fi realizată, în mod convenabil, cu ocazia cântăririi animalului, ceea ce ar reduce la minimum stresul cauzat de manipulare. Observațiile se efectuează cu atenție și se consemnează cu ajutorul sistemelor de notare care au fost definite de către laboratorul de testare. Trebuie depuse eforturi pentru a se asigura că variațiile condițiilor de testare sunt minime. Simptomele urmărite includ, dar nu se limitează la, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, dimensiunea pupilei, respirație anormală). Se consemnează, de asemenea, modificări ale mersului, ale posturii corpului, reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice sau tonice, stereotipie (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate) sau comportament bizar (de exemplu, automutilarea, mersul înapoi).

▼M5

Greutatea corporală și consumul de hrană/apă

38. Animalele P sunt cântărite în prima zi de tratament și cel puțin săptămânal după aceea. În plus, femelele P sunt cântărite în timpul alăptării, în aceleași zile când are loc cântărirea puilor din cuiburile lor (a se vedea punctul 44). Toate animalele F_1 sunt cântărite individual la înțărcare (PND 21) și cel puțin săptămânal după aceea. Greutatea corporală se consemnează, de asemenea, în ziua în care puii ajung la pubertate (finalizarea separării prepuțului sau a permeabilității vaginale). Toate animalele sunt cântărite la sacrificare.

39. Pe parcursul studiului, consumul de hrană și de apă (în cazul administrării substanței chimice în apa de băut) se consemnează cel puțin săptămânal în aceleași zile ca valorile greutății corporale a animalelor (cu excepția perioadei de coabitare). Consumul de hrană al fiecărei cuști cu animale F_1 se consemnează săptămânal începând cu selectarea pentru o cohortă.

Ciclurile estrale

40. Informații preliminare privind efectele asociate substanței de testat asupra ciclului estral pot fi deja disponibile din studii de toxicitate anterioare cu doze repetate și pot fi utilizate pentru elaborarea unui protocol specific substanței de testat pentru studiul extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație. În mod normal, evaluarea ciclicității estrale (prin citologie vaginală) începe la începutul perioadei de tratament și continuă până la confirmarea împerecherii sau până la sfârșitul perioadei de 2 săptămâni pentru împerechere. În cazul în care femelele au fost examinate cu privire la ciclurile estrale normale înainte de tratare, este util să se continue testarea ciclicității odată cu începerea tratamentului, însă, în cazul în care există preocupări cu privire la efecte nespecifice la începutul tratamentului (de exemplu, o scădere semnificativă a consumului de hrană inițial), animalelor li se permite să se adapteze la tratament timp de cel mult două săptămâni înainte de începerea perioadei de testare a ciclicității de 2 săptămâni care conduce la cuplare. În cazul în care perioada de tratament a femelelor este extinsă în acest fel (și anume, un tratament de 4 săptămâni înainte de împerechere), trebuie să se ia în considerare achiziționarea de animale mai tinere și extinderea perioadei de tratament a masculilor înainte de cuplare. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, trebuie avut grijă să se evite orice perturbare a mucoasei și, ulterior, inducerea pseudogestației (10) (11).

41. Frotiul vaginal se examinează zilnic pentru toate femelele F_1 din cohorta 1A, după apariția permeabilității vaginale, până la consemnarea primului frotiu cornificat, pentru a determina intervalul de timp dintre cele două evenimente. De asemenea, se monitorizează ciclurile estrale pentru toate femelele F_1 din cohorta 1A pentru o perioadă de două săptămâni, începând în jurul PND 75. În plus, dacă va fi necesară împerecherea generației F_1, citologia vaginală în cohorta 1B va fi urmărită de la momentul cuplării până la identificarea de dovezi ale împerecherii.

Împerecherea și gestația

42. Pe lângă parametrii standard (de exemplu, greutatea corporală, consumul de hrană, observațiile clinice, inclusiv controale de mortalitate/morbiditate), se consemnează datele cuplării, data inseminării și data fătării și se calculează intervalul precoital (de la cuplare la inseminare) și durata gestației (de la inseminare la fătare). Femelele P se examinează cu atenție în momentul preconizat al fătării pentru orice semne de distocie. Se consemnează orice anomalii în comportamentul de cuibărire sau în performanța alăptării.

▼M5

43. Ziua în care are loc fătarea este ziua de alăptare 0 (LD 0) pentru mamă și ziua 0 după fătare (PND 0) pentru pui. Alternativ, toate comparațiile se pot baza, de asemenea, pe momentul postcoital pentru a elimina confuzia datelor de dezvoltare postnatală, scăzând durata gestației; cu toate acestea, momentul raportat la fătare este, de asemenea, consemnat. Acesta este important mai ales atunci când substanța de testat exercită o influență asupra duratei gestației.

Parametrii puilor

44. Fiecare cuib se examinează cât mai curând posibil după fătare (PND 0 sau PND 1), pentru a stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, precum și prezența anomaliilor macroscopice (anomalii vizibile din exterior, inclusiv palatoschizis, hemoragii subcutanate, culoare sau textură anormală a pielii, prezența cordonului ombilical, lipsa laptelui în stomac, prezența unor secreții uscate). În plus, primul examen clinic al nou-născuților trebuie să includă o evaluare calitativă a temperaturii corpului, starea de activitate și reacția la manipulare. Puii găsiți morți la PND 0 sau la o dată ulterioară se examinează pentru determinarea posibilelor defecte și a cauzei decesului. Puii vii se numără și se cântăresc individual la PND 0 sau PND 1 și în mod regulat după aceea, de exemplu, cel puțin la PND 4, 7, 14 și 21. Examenele clinice, după caz, pentru vârsta animalelor, se repetă la cântărirea puilor sau mai des, dacă la fătare s-au realizat constatări specifice cazului. Simptomele urmărite pot include, dar nu se limitează la, anomalii exterioare, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, mucoaselor, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă. Se consemnează, de asemenea, modificări ale mersului, ale posturii corpului, reacția la manipulare, precum și prezența mișcărilor clonice sau tonice, stereotipie sau comportament bizar.

45. Distanța ano-genitală (DAG) la fiecare pui se măsoară cel puțin o dată de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor se consemnează în ziua în care se măsoară DAG și DAG trebuie normalizată la o măsură în funcție de dimensiunea puiului, de preferință, rădăcina cub a greutății corporale (12). Prezența sfârcurilor/aureolelor la puii de sex masculin se verifică la PND 12 sau 13.

46. Toate animalele F_1 selectate sunt examinate zilnic pentru constatarea separării balano-prepuțiale sau a permeabilității vaginale pentru masculi și, respectiv, femele, care începe înainte de data preconizată pentru atingerea acestor obiective, pentru a detecta dacă maturizarea sexuală se produce mai devreme. Se consemnează orice anomalii ale organelor genitale, cum ar fi fir vaginal persistent, hipospadia sau penis despicat. Maturitatea sexuală a animalelor F_1 se compară cu dezvoltarea fizică prin determinarea vârstei și a greutății corporale la separarea balano-prepuțială sau la deschiderea vaginală la masculi și, respectiv, la femele (13).

Evaluarea neurotoxicității potențiale pentru dezvoltare (cohortele 2A și 2B)

47. Pentru testele de neurotoxicitate se utilizează 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 2A și 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 2B, din fiecare grup de tratament (pentru fiecare grup: 1 mascul sau 1 femelă per cuib; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu). Animalele din cohorta 2A trebuie să fie supuse la testul reacției auditive, o baterie de teste funcționale bazate pe observație, evaluări ale activității motorii (a se vedea punctele 48-50) și neuropatologice (a se vedea punctele 74-75). Trebuie depuse eforturi pentru a se

▼M5

asigura că variațiile condițiilor de testare sunt minime și nu sunt în mod sistematic legate de tratament. Printre variabilele care pot afecta comportamentul sunt nivelul sonor (de exemplu, zgomot intermitent), temperatură, umiditate, iluminat, mirosuri, ora din zi și distrageri de mediu. Rezultatele testelor de neurotoxicitate trebuie interpretate în relație cu intervalele istorice corespunzătoare de referință pentru martor. Animalele din cohorta 2B se utilizează pentru evaluarea neuropatologică la PND 21 sau PND 22 (a se vedea punctele 74-75).

48. Un test al reacției auditive se efectuează la PND 24 (± 1 zi) utilizând animale din cohorta 2A. Ziua de testare ar trebui compensată între grupurile tratate și martor. Fiecare sesiune este formată din 50 de teste. În efectuarea testului reacției auditive, se determină amplitudinea răspunsului mediu la fiecare bloc de 10 teste (5 blocuri de 10 teste), cu condiții de testare optimizate pentru a produce acomodare intrasesiune. Procedurile trebuie să fie în concordanță cu metoda de testare B.53 (35).

49. La un moment adecvat între PND 63 și PND75, animalele din cohorta 2A sunt supuse la o baterie de teste funcționale bazate pe observație și o testare automată a activității motorii. Procedurile trebuie să fie în concordanță cu metodele de testare B.43 (33) și B.53 (35). Bateria de teste funcționale bazate pe observație include o descriere amănunțită a aspectului, a comportamentului și a integrității funcționale a subiectului. Aceste aspecte sunt evaluate prin observații în cușca de adăpostire, după mutarea într-o arenă standard pentru observare (câmp deschis) unde animalul se mișcă în mod liber și prin teste de manipulare. Testarea ar trebui să pornească de la cel mai puțin activ la cel mai interactiv. O listă de măsuri este prezentată în apendicele 1. Toate animalele sunt urmărite cu atenție de către observatori instruiți, care au cunoștință de statutul de tratament al animalelor, utilizând proceduri standardizate pentru a reduce la minimum variabilitatea observatorului. Acolo unde este posibil, se recomandă ca același observator să evalueze animalele într-un anumit test. Dacă acest lucru nu este posibil, este necesar să se demonstreze fiabilitatea interobservatori. Pentru fiecare parametru din bateria de testare a comportamentului, se utilizează bareme și criterii de notare operaționale definite explicit. Dacă este posibil, se elaborează măsuri cantitative obiective pentru parametrii de observație, care implică un clasament subiectiv. Pentru activitatea motorie, fiecare animal este testat individual. Sesiunea de testare trebuie să fie suficient de lungă pentru a demonstra acomodarea intrasesiune pentru martori. Activitatea motorie se monitorizează prin intermediul unui dispozitiv automat de înregistrare a activității care poate detecta atât intensificarea, cât și reducerea activității (de exemplu, activitatea bazală măsurată de dispozitiv nu trebuie să fie atât de scăzută, încât să împiedice detectarea reducerii, nici atât de mare, încât să împiedice detectarea intensificării activității). Fiecare dispozitiv trebuie să fie testat prin metode standard pentru a se asigura, în măsura în care este posibil, fiabilitatea funcționării tuturor dispozitivelor în toate zilele. În măsura în care este posibil, grupurile de tratament se distribuie în mod echilibrat pe toate dispozitivele. Grupurile de tratament trebuie să fie compensate în toate intervalele de testare pentru a evita interpretări eronate provocate de ritmul circadian de activitate.

50. În cazul în care informațiile existente indică necesitatea altor teste funcționale (de exemplu, senzoriale, sociale, cognitive), acestea trebuie să fie integrate fără a compromite integritatea altor evaluări efectuate în cadrul studiului. În cazul în care testarea se efectuează pe aceleași animale utilizate pentru reacție auditivă, bateria de teste funcționale bazate pe observație și testarea activității motorii, trebuie să se programeze teste diferite pentru a reduce la minimum riscul de a compromite integritatea testelor. Procedurile suplimentare pot fi deosebit de utile atunci când observația empirică, efectele anticipate sau modul de acțiune/mecanismul indică un anumit tip de neurotoxicitate.

▼M5

Evaluarea imunotoxicității potențiale pentru dezvoltare (cohorta 3)

51. La PND 56 (± 3 zile), 10 masculi și 10 femele din animalele din cohorta 3 din fiecare grup de tratament (1 mascul sau 1 femelă per cuib; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu) se utilizează pentru testul de răspuns al anticorpilor dependent de celulele T, și anume, răspunsul anticorpilor principali IgM la un antigen dependent de celulele T, cum ar fi celule eritrocitare (Sheep Red. Blood Cells, SRBC) sau hemocianină de Limulus (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH), în conformitate cu procedurile curente de testare a imunotoxicității (14) (15). Răspunsul poate fi evaluat prin numărarea celulelor specifice formatoare de placă (PFC) în splină sau prin determinarea titrului de anticorpi IgM specifici SRBC- sau KLH- în ser prin testul ELISA, în perioada de vârf a răspunsului. De regulă, există patru răspunsuri de vârf (răspuns PFC) sau cinci (test ELISA) de zile de la imunizarea intravenoasă. În cazul în care răspunsul anticorpilor primari este analizat prin numărarea celulelor care formează placa, se permite evaluarea unor subgrupuri de animale în zile separate, cu condiția ca: imunizarea subgrupului și sacrificarea să fie programate astfel încât PFC să fie numărate în perioada de vârf a răspunsului; subgrupurile să includă un număr egal de pui de sex masculin și de sex feminin de la toate grupurile de doze, inclusiv martori; și subgrupurile să fie evaluate aproximativ la aceeași vârstă după fătare. Expunerea la substanța de testat va continua până în ziua dinaintea colectării splinelor pentru răspunsul PFC sau a serului pentru testul ELISA.

Evaluarea de urmărire a toxicității potențiale pentru reproducere (cohorta 1B)

52. Animalele din cohorta 1B se pot menține sub tratament după PND 90 și pot fi crescute pentru a obține o generație F_2, dacă este necesar. Se plasează în coabitare masculi și femele din același grup de doză (evitând cuplarea între frați) timp de până la două săptămâni, începând de la PND 90, dar fără a depăși PND 120. Procedurile trebuie să fie similare cu cele pentru animalele P. Cu toate acestea, pe baza forței probante a dovezilor, ar putea fi suficientă eliminarea puilor la PND 4, mai degrabă decât urmărirea acestora până la înțărcare sau ulterior.

OBSERVAȚIILE FINALE

Biochimie clinică/hematologie

53. Efectele sistemice se monitorizează la animalele P. Se prelevează probe de sânge după repaus alimentar dintr-o zonă definită de la zece masculi și femele P selectați aleatoriu, pe grup de doză la sacrificare, se depozitează în condiții adecvate și se supun unei analize hematologice parțiale sau complete de biochimie clinică de T4 și TSH sau alte examene sugerate de profilul de efect cunoscut al substanței de testat [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Se examinează următorii parametri hematologici: hematocritul, concentrația hemoglobinei, numărul de eritrocite, numărul de leucocite diferențial și total, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare a sângelui. Investigațiile plasmei sau ale serului includ: glucoză, colesterol total, uree, creatinină, proteine totale, albumină și cel puțin două enzime care indică efectele hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, fosfataza alcalină, gama-glutamil transpeptidaza și sorbitol dehidrogenaza). Măsurători ale altor enzime și acizi biliari pot furniza informații utile în anumite circumstanțe. În plus, se poate preleva și depozita sânge de la toate animalele pentru o posibilă analiză la un moment ulterior cu scopul de a clarifica unele efecte neclare sau de a genera date de expunere internă. Dacă nu se intenționează o a doua împerechere a animalelor P, probele de

▼M5

sânge sunt obținute imediat înainte de procedura de sacrificare programată sau ca parte a acesteia. În cazul în care se păstrează animalele, probele de sânge se colectează cu câteva zile înainte ca animalele să fie împerecheate pentru a doua oară. Cu excepția cazului în care datele existente de la studii cu doze repetate arată că parametrul nu este afectat de substanța de testat, analiza urinei se efectuează înainte de sacrificare, analizându-se următorii parametri: aspect, volum, osmolaritate sau densitate specifică, pH, proteine, glucoză, sânge și celule sangvine, celulele deteriorate. De asemenea, urina se poate colecta în vederea monitorizării excreției de substanță chimică de testat și/sau metabolit/metaboliți.

54. Efectele sistemice se monitorizează, de asemenea, la animalele F_1. Se prelevează probe de sânge după repaus alimentar dintr-o zonă definită de la zece masculi și femele 1A selectați aleator, pe grup de doză la sacrificare, se depozitează în condiții adecvate și supun unei analize de biochimie clinică standard, inclusiv unei evaluări ale nivelului seric de hormoni tiroidieni (T4 și TSH), hematologice (leucocite diferențial și total plus numărul de eritrocite) și testul de urină.

55. Surplusul de pui la PND 4 este supus autopsiei macroscopice, avându-se în vedere măsurarea concentrației de hormon tiroidian seric (T4). În cazul în care este necesar, se poate colecta în comun sânge neonatal (PND 4) pe cuiburi pentru analize biochimice/ale hormonilor tiroidieni. De asemenea, se colectează sânge pentru analiza T4 și TSH de la pui înțărcați supuși autopsiei macroscopice la PND 22 (pui F_1 care nu au fost selectați pentru cohorte).

Parametrii de evaluare a spermei

56. Parametrii de evaluare a spermei se măsoară pentru toți masculii din generația P, cu excepția cazului în care există date existente pentru a demonstra că parametrii de evaluare a spermei nu sunt afectați într-un studiu de 90 de zile. Examinarea parametrilor de evaluare a spermei se realizează la nivelul tuturor masculilor din cohorta 1A.

57. La sacrificare, se consemnează valorile greutății testiculelor și a epididimului pentru toți masculii P și F_1 (cohorta 1A). Cel puțin un testicul și un epididim sunt rezervate pentru examenul histopatologic. Restul de epididim se utilizează pentru inventarierea rezervelor de spermă din porțiunea caudală a epididimului (16) (17). În plus, sperma din porțiunea caudală a epididimului (sau vase deferente) se colectează prin metode care reduc la minimum daunele pentru evaluarea motilității și a morfologiei (18).

58. Motilitatea spermatozoizilor poate fi evaluată imediat după sacrificare sau poate fi consemnată pentru o analiză ulterioară. Procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă ar putea fi determinat fie subiectiv, fie obiectiv prin analiza asistată de calculator a mișcării (19) (20) (21) (22) (23) (24). Pentru evaluarea morfologiei spermei, se examinează o probă de spermă din epididim (sau din vasele deferente) sub formă de preparate umede sau fixe (25) și cel puțin 200 de spermatozoizi per eșantion trebuie să se clasifice ca normali (atât capul, cât și partea mijlocie/coada par normale) sau anormali. Exemple de anomalii morfologice ale spermatozoizilor includ fuziunea, capete izolate și capete și/sau cozi diforme (26). Capetele de spermatozoizi mari sau diforme pot indica defecte de spermiație.

59. În cazul în care eșantioanele sunt congelate, frotiuri fixe și imagini pentru analiza motilității spermei sunt înregistrate la momentul autopsiei (27), analiza ulterioară putând fi limitată la masculi din grupul martor și grupul tratat cu doze ridicate. Cu toate acestea, în cazul în care se observă efecte corelate cu tratamentul, se evaluează, de asemenea, grupurile tratate cu doze mai mici.

▼M5

Autopsie macroscopică

60. La momentul sacrificării sau al decesului prematur, toate animalele P și F_1 sunt supuse autopsiei și sunt examinate macroscopic pentru orice anomalii structurale sau modificări patologice. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Puii care sunt eutanasiați în stare muribundă și puii morți sunt înregistrați și, atunci când nu sunt macerați, sunt examinați pentru determinarea eventualelor defecte și/sau a cauzei decesului și sunt conservați.

61. Pentru femelele adulte P și F_1, se examinează un frotiu vaginal în ziua autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu examenul histopatologic la nivelul organelor de reproducere. Uterele de la toate femelele P (și femelele F_1, dacă este cazul) sunt examinate pentru a determina prezența și numărul locurilor de implantare, într-un mod care să nu compromită evaluarea histopatologică.

Greutatea organelor și conservarea țesuturilor — animale adulte P și F_1

62. La momentul sacrificării, se stabilesc valorile greutății corporale și ale greutății umede a organelor enumerate mai jos la toate animalele P și la toți adulții F_1 din cohortele relevante (astfel cum se arată de mai jos), cât mai curând posibil după disecție, pentru a evita uscarea. Ulterior organele trebuie conservate în condiții corespunzătoare. Dacă nu se specifică altfel, organele pereche pot fi cântărite individual sau combinat, în concordanță cu practica obișnuită a laboratorului executant:

— uterul (cu oviducte și col), ovarele;

— testiculele, epididimidele (total și partea caudală pentru probele utilizate pentru numărarea spermatozoizilor);

— prostata (părțile dorsolaterale și ventrale combinate). Trebuie să se procedeze cu atenție la curățarea complexului prostatei pentru a evita puncția veziculelor seminale umplute cu fluid. În cazul în care se constată efecte corelate tratamentului asupra greutății totale a prostatei, segmentele dorsolaterale și ventrale se disecă cu atenție după fixare și se cântăresc separat;

— veziculele seminale cu glande coagulante și fluidele lor (ca o singură unitate);

— creier, ficat, rinichi, inimă, splină, timus, glanda pituitară, glanda tiroidă (postfixare), glandele suprarenale și organe sau țesuturi țintă cunoscute.

63. Pe lângă organele enumerate mai sus, probe de nerv periferic, mușchi, măduva spinării, ochi plus nervul optic, tract gastrointestinal, vezică urinară, plămân, trahee (cu tiroida și paratiroide atașate), măduvă osoasă, vase deferente (masculi), glande mamare (masculi și femele) și vagin sunt păstrate în condiții adecvate.

64. La animalele din cohorta 1A, toate organele sunt cântărite și păstrate pentru efectuarea unui examen histopatologic.

65. Pentru investigarea efectelor imunotoxice induse pre- și postnatal, 10 masculi și 10 femele dintre animalele din cohorta 1A din fiecare grup de tratament (1 mascul sau 1 femelă per cuib; toate cuiburile sunt reprezentate de cel puțin 1 pui; selectate aleatoriu), vor fi supuse la următoarele teste la sacrificare:

— cântărirea ganglionilor limfatici asociați și îndepărtați de calea de expunere (pe lângă greutatea glandelor suprarenale, a timusului și a splinei, deja determinată la toate animalele din cohorta 1A);

▼M5

— analiza subpopulațiilor de limfocite splenice [limfocite CD4 + și CD8 + T, limfocite B și celule ucigașe (*natural killer*, NK)] utilizând o jumătate din splină, cealaltă jumătate a splinei fiind păstrată pentru evaluarea histopatologică.

Analiza subpopulațiilor de limfocite splenice la animale neimunizate (cohorta 1A) va stabili dacă expunerea este legată de o schimbare a distribuției stării echilibrate imunologice la limfocite „ajutor" (CD4 +) sau citotoxice (CD8 +) derivate din timus sau la celule ucigașe (NK) (răspunsuri rapide la celule neoplazice și la agenți patogeni).

66. La animalele din cohorta 1B, următoarele organe sunt cântărite și țesuturile corespunzătoare sunt prelucrate în etapa bloc:

— vaginul (nu a fost cântărit);

— uterul cu colul uterin;

— ovarele;

— testiculele (cel puțin unul);

— epididimele;

— veziculele seminale și glandele coagulante;

— prostata;

— glanda pituitară;

— organele țintă identificate.

Histopatologia în cohorta 1B se efectuează în cazul în care rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare sau în cazul substanțelor suspectate de efecte toxice asupra reproducerii sau asupra glandelor endocrine.

67. Cohortele 2A și 2B: teste de neurotoxicitate pentru dezvoltare (PND 21 sau PND 22 și pui adulți). Animalele din cohorta 2A sunt sacrificate după testarea comportamentului, cu consemnarea greutății creierului și neurohistopatologie completă în scopuri de evaluare a neurotoxicității. Animalele din cohorta 2B sunt sacrificate la PND 21 sau PND 22, cu consemnarea greutății creierului și examinarea microscopică a creierului în scopuri de evaluare a neurotoxicității. Este necesară fixarea prin perfuzie pentru animalele din cohorta 2A și opțional pentru animalele din cohorta 2B, astfel cum se specifică în metoda de testare B.53 (35).

Greutatea organelor și conservarea țesuturilor — puii înțărcați F_1

68. Puii care nu au fost selectați pentru cohorte, inclusiv puii mai mici decât normal, sunt sacrificați după înțărcare, la PND 22, cu excepția cazului în care rezultatele indică necesitatea mai multor investigații în-viață. Puii sacrificați sunt supuși autopsiei macroscopice, inclusiv o evaluare a organelor de reproducere, astfel cum este descris la punctele 62 și 63. Pentru până la 10 pui pe sex pe grup, din cât mai multe cuiburi posibil, creierul, splina și timusul se cântăresc și se păstrează în condiții adecvate. În plus, se pot păstra țesuturile mamare pentru puii de sex masculin și de sex feminin pentru mai multe analize microscopice suplimentare ([1]) [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Anomaliile macroscopice și țesuturile țintă se păstrează pentru o eventuală examinare histologică.

([1]) Cercetările au arătat că glanda mamară, în special în ciclurile de viață timpurii ale dezvoltării glandei mamare, este un parametru sensibil pentru acțiunea estrogenilor. Se recomandă ca parametrii care implică glandele mamare ale puilor de ambele sexe să fie incluși în prezenta metodă de testare, atunci când va fi validată.

▼M5

Histopatologie — animalele P

69. Se efectuează examenul histopatologic complet al organelor enumerate la punctele 62 și 63 pentru toate animalele martor P și animalele tratate cu doze ridicate. De asemenea, se examinează organele care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. În plus, organele de reproducere ale tuturor animalelor suspectate de fertilitate redusă, de exemplu, cele care nu s-au împerecheat, nu au conceput, nu au însămânțat sau nu au fătat pui sănătoși sau la care au fost afectate ciclicitatea estrală sau numărul, motilitatea sau morfologia spermatozoizilor, precum și toate leziunile macroscopice se supun evaluării histopatologice.

Histopatologie — animalele F_1

Animale din cohorta 1

70. Se efectuează examenul histopatologic complet al organelor enumerate la punctele 62 și 63 pentru toate animalele martor adulte și animalele tratate cu doze ridicate din cohorta 1A. Toate cuiburile trebuie să fie reprezentate de cel puțin 1 pui de fiecare sex. De asemenea, se examinează organele și țesuturile care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. Pentru evaluarea efectelor induse pre- și postnatal asupra organelor limfoide, se efectuează, de asemenea, examenul histopatologic pe ganglionii limfatici colectați și măduva osoasă de la 10 masculi și 10 femele dintre animalele din cohorta 1A, pe lângă evaluarea histopatologică a timusului, a splinei și a glandelor suprarenale deja efectuate la toate animalele 1A.

71. Țesuturile de reproducere și endocrine de la toate animalele din cohorta 1B, prelucrate în etapa bloc, astfel cum este descris la punctul 66, se examinează pentru determinarea histopatologiei în cazul substanțelor suspectate de efecte toxice asupra reproducerii sau asupra sistemului endocrin. De asemenea, cohorta 1B se supune examenului histologic dacă rezultatele de la cohorta 1A sunt neclare.

72. Ovarele de femele adulte trebuie să conțină foliculi primordiali și în creștere, precum și corpi galbeni; prin urmare, un examen histopatologic va viza realizarea unei evaluări cantitative a foliculilor primordiali și a foliculilor mici în creștere, precum și a corpilor galbeni la femelele F1; numărul de animale, selectarea secțiunii ovariene și mărimea secțiunii eșantion trebuie să fie adecvate statistic pentru procedura de evaluare utilizată. Enumerarea foliculară poate fi efectuată mai întâi pe animale martor și animale tratate cu doze mari, iar în cazul unui efect advers detectat la acestea din urmă, se examinează, de asemenea, animalele tratate cu doze mai mici. Examenul include numărarea foliculilor primordiali, care pot fi combinați cu foliculi mici în creștere, pentru compararea ovarelor tratate și a ovarelor martor [a se vedea documentul de orientare nr. 151 al OCDE (40)]. Evaluarea corpului galben se desfășoară în paralel cu testarea ciclului estral, astfel încât etapa ciclului să poată fi luată în considerare în cadrul evaluării. Oviductul, uterul și vaginul sunt examinate pentru determinarea dezvoltării corespunzătoare tipice a organelor.

73. Se efectuează examene histopatologice testiculare detaliate la masculii F_1 pentru a identifica efectele corelate tratamentului asupra diferențierii și dezvoltării testiculelor și asupra spermatogenezei (38). Atunci când este posibil, se examinează secțiuni ale *rete testis*. Capul, corpul și partea caudală a epididimului și vasele deferente sunt examinate pentru determinarea dezvoltării corespunzătoare tipice a organelor, precum și pentru determinarea parametrilor necesari pentru masculii P.

▼M5

Animale din cohorta 2

74. Se efectuează examenul neurohistopatologic pentru toate animalele martor și animalele tratate cu doze mari din cohorta 2A pe sexe după încheierea testelor neuro-comportamentale (după PND 75, dar fără a depăși PND 90). Se efectuează examenul histopatologic al creierului pentru toate animalele martor și animalele tratate cu doze mari din cohorta 2B pe sexe la PND 21 sau PND 22. De asemenea, se examinează organele și țesuturile care prezintă modificări legate de tratament la toate animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la stabilirea NOAEL. Organele sau țesuturile care demonstrează modificări legate de tratament ar trebui să fie, de asemenea, examinate pentru animalele din grupurile de doze mai mici pentru a contribui la determinarea NOAEL. Pentru animalele din cohorta 2A și 2B, se examinează mai multe secțiuni de creier pentru a permite examinarea bulbilor olfactivi, a cortexului cerebral, a hipocampului, a ganglionilor bazali, a talamusului, a hipotalamusului, a creierului mijlociu (*thecum*, *tegmentum* și pedunculi cerebrali), a trunchiului cerebral și a cerebelului. Doar pentru cohorta 2A, se examinează ochii (retina și nervul optic) și probe de nerv periferic, mușchi și măduva spinării. Toate procedurile neurohistologice trebuie să fie în concordanță cu metoda de testare B.53 (35).

75. Evaluările morfometrice (cantitative) se efectuează pe zone reprezentative ale creierului (secțiunile omoloage atent selectate pe bază de repere microscopice fiabile) și pot include măsurători liniare și/sau areale ale unor regiuni specifice ale creierului. Trebuie să se preleveze cel puțin trei secțiuni consecutive la fiecare punct de reper (nivel), pentru a selecta secțiunea omoloagă cea mai reprezentativă pentru zona specifică a creierului care va fi evaluată. Neuropatologul trebuie să decidă dacă secțiunile pregătite pentru măsurare sunt omoloage cu altele în setul de probe și, prin urmare, dacă sunt potrivite pentru a fi incluse, întrucât măsurătorile liniare, în special, se pot schimba pe o distanță relativ scurtă (28). Nu trebuie utilizate secțiuni neomoloage. În timp ce obiectivul este de a preleva probe de la toate animalele rezervate pentru acest scop (10/sex/nivel de doză), un număr mai mic de probe poate fi totuși adecvat. Cu toate acestea, prelevarea de probe de la mai puțin de 6 animale/sex/nivel de doză ar putea, în general, să nu fie considerată suficientă în scopurile prezentei metode de testare. Se poate utiliza stereologia pentru a identifica efectele legate de tratament asupra unor parametri, cum ar fi volumul sau numărul de celule pentru regiuni neuroanatomice specifice. Toate aspectele legate de pregătirea probelor de țesuturi, de la fixarea țesuturilor, la disecția de probe de țesuturi, la prelucrarea țesuturilor și până la colorarea lamelelor, trebuie să utilizeze un concept compensat, astfel încât fiecare lot să conțină probe reprezentative de la fiecare grup de doză. Atunci când urmează să se utilizeze analize morfometrice sau stereologice, țesutul cerebral trebuie integrat în medii adecvate pentru toate dozele în același timp, pentru a evita contracția probelor asociată cu depozitarea prelungită în fixativ.

RAPORT

Date

76. Datele se raportează individual și se sistematizează în tabele. Acolo unde este cazul, pentru fiecare grup de testare și pentru fiecare generație, se raportează următoarele: numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte pe parcursul testului sau sacrificate fără suferință, ora oricăror decese sau eutanasieri, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de femele care nasc pui și numărul de animale care prezintă semne de toxicitate. De asemenea, se raportează o descriere a toxicității, inclusiv momentul apariției, durata și severitatea.

77. Rezultatele numerice sunt evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și acceptate. Metodele statistice se selectează ca parte a conceptului de studiu și abordează în mod corespunzător datele care nu au o distribuție normală (de exemplu, date de numărare), datele cenzurate (de exemplu, timp de observare limitat), nonindependența (de exemplu, efecte care țin de seria de pui și măsuri repetate) și variațele inegale.

▼M5

Modelele mixte liniare generalizate și modelele doză-răspuns acoperă o clasă largă de instrumente analitice care ar putea fi necesare pentru datele generate în conformitate cu prezenta metodă de testare. Raportul trebuie să includă suficiente informații cu privire la metoda de analiză și programul computerizat utilizat, astfel încât un referent/statistician independent să poată evalua/reevalua analiza.

Evaluarea rezultatelor

78. Constatările trebuie evaluate din punct de vedere al efectelor observate, inclusiv autopsia și observațiile microscopice. Evaluarea include relația, sau inexistența acesteia, între doză și prezența, incidența și severitatea anomaliilor, inclusiv leziuni macroscopice. De asemenea, trebuie să se evalueze organele țintă, fertilitatea, anomaliile clinice, performanța de reproducere și a puilor, variații ale greutății corporale, mortalitatea și alte efecte toxice și efectele de dezvoltare. Se acordă o atenție deosebită modificărilor specifice sexului. În evaluarea rezultatelor testelor, trebuie să se țină seama de proprietățile fizico-chimice ale substanței de testat și, dacă sunt disponibile, de datele TK, inclusiv transferul placentar și excreția de lapte.

Raportul de testare

79. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații obținute în cadrul studiului privind animalele P, F_1 și F_2 (dacă este cazul):

Substanța chimică de testat:

— toate informațiile pertinente disponibile privind proprietățile chimice, toxicocinetice și toxicodinamice ale substanței chimice de testat;

— datele de identificare;

— puritate.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului (dacă este altul decât apa).

Animale de laborator:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpostire, hrană, materiale pentru cuibărire etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului;

— datele privind frotiul vaginal pentru femelele P înainte de începerea tratamentului (în cazul în care datele sunt colectate la acea dată);

— înregistrări privind cuplarea referitoare la generația P, indicând partenerii de sex masculin și de sex feminin ai unei împerecheri și reușita împerecherii;

— înregistrări privind cuibul de origine pentru animalele adulte din generația F_1.

Condiții de testare:

— justificarea alegerii dozei;

— detalii privind prepararea substanței de testat/prepararea hranei, concentrațiile obținute;

▼M5

— stabilitatea și omogenitatea preparatului în vehicul sau purtător (de exemplu, hrană, apă potabilă), în sânge și/sau lapte, în condiții de utilizare și depozitare între utilizări;

— detalii privind administrarea substanței de testat;

— conversia de la concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apă potabilă la doza obținută (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei (inclusiv compoziția hranei, dacă este disponibilă);

— descrierea detaliată a procedurilor de randomizare pentru a selecta puii pentru sacrificare și pentru a distribui puii în grupurile de testare;

— condiții de mediu;

— lista personalului de studiu, inclusiv de formare profesională.

Rezultate (rezumat și date individuale pe sexe și doză):

— consumul alimentar, consumul de apă în cazul în care este disponibil, eficiența alimentară (creștere în greutatea corporală per gram de alimente consumate, cu excepția perioadei de coabitare și în timpul alăptării) și consumul de substanță de testat (pentru administrarea prin hrană/apă potabilă) pentru animalele P și F_1;

— datele privind absorbția (dacă sunt disponibile);

— informații cu privire la greutatea corporală a animalelor P;

— informații cu privire la greutatea corporală a animalelor după înțărcare selectate în F_1;

— momentul decesului în timpul studiului sau dacă animalele au supraviețuit sau nu până la sacrificare;

— natura, severitatea și durata efectelor clinice (eventual, reversibilitatea acestora);

— datele privind hematologia, analiza urinei și chimia clinică, inclusiv TSH și T4;

— analiza fenotipică a celulelor splenice (celulele T-, B-, NK-);

— celularitatea măduvei osoase;

— datele privind răspunsul toxic;

— numărul de femele P și F_1 cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;

— intervalul de timp până la împerechere (interval precoital, numărul de zile între cuplare și împerechere);

— efectele toxice sau de alt tip asupra reproducerii, inclusiv numărul și proporția de animale care realizează împerecherea, gestația, fătarea și lactația, de masculi care induc gestația, de femele cu simptome de distocie/fătare prelungită sau dificilă;

— durata gestației și, dacă se cunoaște, a fătării;

— numărul de implantări, mărimea cuibului și procentul de pui masculi;

— numărul și procentajul de pierderi postimplantare, pui născuți vii și pui născuți morți;

▼M5

— datele privind greutatea cuibului și a puilor (masculi, femele și combinat), numărul de pui mai mici decât normal, dacă s-a determinat;

— numărul de pui cu anomalii vizibile, macroscopice;

— efectele toxice sau de alt tip asupra evoluției postnatale a puilor, viabilitatea acestora etc.;

— datele privind reperele fizice la pui și alte date privind dezvoltarea postnatală;

— datele privind maturizarea sexuală a animalelor F_1;

— datele privind observațiile funcționale la pui și adulți, după caz;

— greutatea corporală la sacrificare și datele absolute și relative de greutate a organelor pentru animalele P și animalele adulte F_1;

— rezultatele autopsiei;

— descrierea detaliată a tuturor observațiilor histopatologice;

— numărul total de spermatozoizi din epididimul caudal, procentul de spermatozoizi cu motilitate progresivă, procentul de spermatozoizi normali morfologic și procentul de spermatozoizi cu fiecare anomalie identificată pentru masculii P și F_1;

— numerele și etapele de maturizare ale foliculilor din ovarele femelelor P și F_1, acolo unde este cazul;

— enumerarea de corpi galbeni din ovarele femelelor F_1;

— prelucrarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Parametrii cohortei 2:

— descrierea detaliată a procedurilor utilizate pentru a standardiza observațiile și procedurile, precum și definițiile operaționale pentru notarea observațiilor;

— lista tuturor metodelor de testare utilizate și justificarea utilizării acestora;

— detaliile privind procedurile comportamentale/funcționale, neuropatologice și morfometrice utilizate, inclusiv informații și detalii privind dispozitivele automatizate;

— procedurile de calibrare și de asigurare a echivalenței dispozitivelor și echilibrarea grupurilor de tratament în procedurile de testare;

— scurtă justificare care să explice orice decizii care implică judecata profesională;

— descrierea detaliată a tuturor constatărilor comportamentale/funcționale, neuropatologice și morfometrice pe sexe și pe grup de doză, inclusiv creșteri și scăderi față de martori;

— greutatea creierului;

— orice diagnostice derivate din simptome neurologice și leziuni, inclusiv boli sau afecțiuni care apar în mod natural;

— radiografii ale unor constatări exemplare;

— radiografii cu consum redus pentru a evalua omologia secțiunilor utilizate pentru morfometrie;

▼M5

— tratarea statistică a rezultatelor, inclusiv modele statistice utilizate la analizarea rezultatelor, precum și rezultatele, indiferent dacă acestea au fost sau nu semnificative;

— relația dintre orice alte efecte toxice și concluzia privind potențialul neurotoxic al substanței de testat, pe sexe și pe grup de doză;

— impactul oricăror informații toxicocinetice asupra concluziilor;

— date care sprijină fiabilitatea și sensibilitatea metodei de testare (de exemplu, date de martor istoric și pozitiv);

— relațiile, dacă este cazul, între efectele neuropatologice și cele funcționale;

— NOAEL sau doza de referință pentru mame și pui, pe sexe și grup de doză;

— discuții cu privire la interpretarea globală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică a provocat sau nu neurotoxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

Parametrii cohortei 3:

— titrele anticorpilor IgM serici (sensibilizarea la SRBC sau KLH) sau unități IgM PFC splenice (sensibilizare la SRBC);

— performanța metodei TDAR trebuie confirmată ca parte a procesului de optimizare prin inițierea de către laborator a analizei pentru prima dată și în mod periodic (de exemplu, anual) de toate laboratoarele;

— discuții cu privire la interpretarea globală a datelor pe baza rezultatelor, inclusiv o concluzie dacă substanța chimică a provocat sau nu imunotoxicitate pentru dezvoltare și NOAEL.

Discutarea rezultatelor

Concluzii, inclusiv valorile NOAEL pentru efectele asupra părinților și asupra puilor

De asemenea, se furnizează toate informațiile care nu au fost obținute în timpul studiului, dar care sunt utile pentru interpretarea rezultatelor (de exemplu, asemănări cu efectele oricăror substanțe cunoscute cu efecte neurotoxice).

Interpretarea rezultatelor

80. Un studiu extins de toxicitate pentru reproducere efectuat pe o generație va furniza informații privind efectele expunerii repetate la o substanță chimică în toate etapele ciclului de reproducere, după caz. În special, studiul furnizează informații cu privire la sistemul reproducător și la dezvoltarea, creșterea, supraviețuirea și parametrii funcționali ai puilor până la PND 90.

81. Interpretarea rezultatelor studiului trebuie să ia în considerare toate informațiile disponibile cu privire la substanța chimică, inclusiv proprietățile fizico-chimice, TK și toxicodinamice, informațiile relevante disponibile cu privire la analogi structurali, precum și rezultatele studiilor de toxicitate efectuate anterior cu substanța de testat (de exemplu, toxicitate acută, toxicitate după aplicare repetată, studii mecaniciste și studii de evaluare în cazul în care există diferențe calitative și cantitative semnificative la nivelul speciei referitoare la proprietățile metabolice *in vivo/in vitro*). Rezultatele autopsiei macroscopice și cu privire la greutatea organelor trebuie să fie evaluate în corelație cu observațiile din alte studii cu doze repetate, atunci când acest lucru este fezabil. Scăderile la nivelul dezvoltării puilor ar putea fi considerate în relație cu o influență a substanței chimice de testat asupra compoziției laptelui (29).

▼M5

Cohorta 2 (neurotoxicitatea pentru dezvoltare)

82. Rezultatele neuropatologice și neurocomportamentale trebuie interpretate în contextul tuturor constatărilor, prin intermediul abordării axate pe forța probantă a dovezilor cu expertiză. Trebuie discutate modelele de constatări comportamentale sau morfologice, în cazul în care acestea sunt prezente, precum și dovezile referitoare la relația doză-efect. Evaluarea neurotoxicității pentru dezvoltare, inclusiv studii epidemiologice umane sau rapoarte de caz și studii experimentale pe animale (de exemplu, datele toxicocinetice, informații de structură-activitate, date de la alte studii de toxicitate), trebuie să fie cuprinsă în caracterizare. Evaluarea datelor trebuie să includă o discuție a semnificației biologice și statistice. Evaluarea trebuie să includă relația, dacă există, între modificările neuropatologice și comportamentale observate. Pentru orientări privind interpretarea rezultatelor de neurotoxicitate pentru dezvoltare, a se vedea metoda de testare B.53 (35) și Tyl et al., 2008 (31).

Cohorta 3 (imunotoxicitatea pentru dezvoltare)

83. Suprimarea sau consolidarea funcției imunitare, astfel cum au fost evaluate cu ajutorul TDAR (răspunsul anticorpilor dependent de celulele T), trebuie evaluate în contextul tuturor observațiilor realizate. Semnificația rezultatului testului TDAR poate fi susținută de alte efecte asupra indicatorilor imunologici (de exemplu, celularitatea măduvei osoase, greutatea și histopatologia țesuturilor limfoide, distribuția subsetului de limfocite). Efectele stabilite de TDAR ar putea fi mai puțin semnificative în cazul altor fenomene toxice observate la concentrații de expunere mai mici.

84. Documentul de orientare nr. 43 al OCDE ar trebui să fie consultat pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și neurotoxicitatea (26).

BIBLIOGRAFIE

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment, *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets, *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530-536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group, International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment, *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey, *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼M5

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies, *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology, *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), Cycles and Seasons, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat, *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing, *Methods*, 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation, *Toxicology*, 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat, *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats, *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology*,5, 39-44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report, *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), Methods for Assessing Rat Sperm Motility, *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration, *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations, *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations, *Journal of Andrology*, 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants, *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility, *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), A „Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today, *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats, *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Capitolul B.43 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate la rozătoare.

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Capitolul B.53 din prezenta anexă, Studiu de neurotoxicitate pentru dezvoltare.

(36) Capitolul B.54 din prezenta anexă, Biotestul uterotrofic la rozătoare: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți estrogenice.

(37) Capitolul B.55 din prezenta anexă, Biotestul Hershberger la șobolani: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți (anti)androgenice.

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Apendicele 1

Măsurile și observațiile incluse în bateriile de teste funcționale bazate pe observație (Cohorta 2A)

Cuști și câmp deschis	Manipulare	Fiziologic
Postura corpului	Scoatere ușoară	Temperatură
Mișcări clonice și tonice involuntare	Manipulare ușoară	Greutate corporală
Închidere palpebrală	Tonus muscular	Reacția pupilei
Erecție piloasă	Reacție la apropiere	Dimensiunea pupilei
Salivație	Reacție la atingere	
Lăcrimare	Reacție auditivă	
Vocalizări	Reacție la ciupirea cozii	
Ridicare pe labele din spate	Reacție de îndreptare	
Anomalii de mers	Alunecarea piciorului la aterizare	
Excitare	Forță de apucare cu laba din față	
Stereotipie	Forță de apucare cu laba din spate	
Comportament bizar		
Pete		
Anomalii respiratorii		

▼**M5**

Apendicele 2

DEFINIȚII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec de substanțe.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

▼M5

B.57. TESTUL DE STEROIDOGENEZĂ A H295R

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 456 (2011). În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea posibililor perturbatori endocrini. Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini din 2002 cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică (1). Testul de steroidogeneză H295R *in vitro* (H295R) descris în prezenta metodă de testare utilizează o linie de celule adenocarcinom umane (celule NCI-H295R) și constituie un „test *in vitro*, furnizând date mecaniciste" de nivel 2, care se utilizează în scopuri de depistare și prioritizare. Dezvoltarea și standardizarea testului ca test de depistare a efectelor chimice asupra steroidogenezei, și anume, asupra producției de estradiol 17β (E2) și testosteron (T), s-a efectuat printr-un proces cu mai multe etape. Testul H295R a fost optimizat și validat (2) (3) (4) (5).

2. Obiectivul testului de steroidogeneză H295R este depistarea substanțelor chimice care afectează producția de E2 și T. Testul H295R este destinat identificării substanțelor xenobiotice care au ca țintă (ținte) componentele endogene care alcătuiesc mecanismul biochimic intracelular începând cu secvența de reacții de la colesterol la producerea de E2 și/sau T. Testul H295R nu este destinat identificării substanțelor chimice care afectează steroidogeneza din cauza efectelor asupra axului hipotalamic-pituitar-gonadal (HPG). Scopul testului este de a oferi un răspuns DA/NU în ceea ce privește potențialul unei substanțe chimice de a induce sau a inhiba producerea de T și E2; cu toate acestea, în unele cazuri se pot obține rezultate cantitative (a se vedea punctele 53 și 54). Rezultatele testului sunt exprimate ca modificările relative la nivelul producției de hormoni în comparație cu martorii pentru solvent (MS). Testul nu este menit să furnizeze informații referitoare la mecanismul specific privind interacțiunea substanței de testat cu sistemul endocrin. Cercetările au fost efectuate utilizând linia celulară pentru a identifica efecte asupra unor enzime specifice și hormoni intermediari, cum ar fi progesteronul (2).

3. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendice. Un protocol detaliat, inclusiv instrucțiuni privind modul de elaborare a soluțiilor, cultivarea celulelor și efectuarea diferitelor aspecte ale testului, este disponibil ca apendicele I-III la documentul OCDE „Validarea interlaboratoare a testului de steroidogeneză H295R pentru a identifica modulatori ai producției de testosteron și estradiol" (4).

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITE DE APLICARE

4. Cinci enzime diferite care catalizează șase reacții distincte sunt implicate în biosinteza hormonilor steroizi sexuali. Conversia enzimatică a colesterolului la pregnenolon prin enzima (CYP11A) de disociere laterală a colesterolului citocrom P450 (CYP) constituie un prim pas într-o serie de reacții biochimice care se încheie cu sinteza de steroizi ca produse finite. În funcție de ordinea următoarelor două reacții, mecanismul steroidogenic se împarte în două: mecanismul Δ^5-hidroxisteroid și mecanismul Δ^4ketosteroid, care converg în producția de androstendion (figura 1).

5. Androstenedionul este convertit în testosteron (T) de către dehidrogenaza 17βhidroxisteroidului (17β-HDS). Testosteronul este atât un produs intermediar, cât și un hormon produs final. La masculi, T poate fi convertit la dihidrotestosteron (DHT) de 5α-reductaza, care se găsește în membranele celulare, anvelopa nucleară și reticulul endoplasmic al țesuturilor vizate de acțiunile androgenice, cum ar fi prostata și veziculele seminale. DHT este semnificativ mai puternic ca androgen decât T și este, de asemenea, considerat un hormon produs finit. Testul H295R nu măsoară DHT (a se vedea punctul 10).

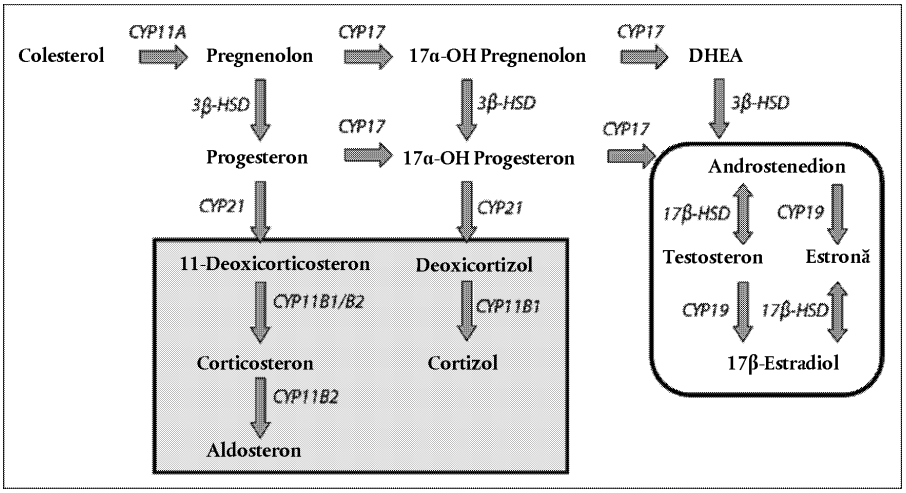
▼M5

6. Enzima din mecanismul steroidogenic care transformă substanțele chimice androgenice în substanțe chimice estrogenice chimice este aromataza (CYP19). CYP19 transformă T în 17β-estradiol (E2) și androstenedion în estron. E2 și T sunt considerați hormoni produși finali pe filieră steroidogenică.

7. Specificitatea activității liazei diferă în cazul CYP17 pentru substraturile intermediare între specii. La om, enzima favorizează substraturi ale mecanismului Δ^5-hidroxisteroid (pregnenolon), în timp ce substraturile din mecanismul Δ^4-ketosteroid (progesteron) sunt favorizate la șobolan (19). Astfel de diferențe în activitatea liazei CYP17 pot explica unele diferențe dependente de specii, ca răspuns la substanțele chimice care modifică steroidogeneza *in vivo* (6). Celulele H295 s-au dovedit a reflecta mai îndeaproape expresia enzimei adrenale adulte umane și modelul de producere a steroizilor (20), dar se știe că acestea exprimă enzime atât pentru mecanismul Δ^5hidroxisteroid, cât și pentru mecanismul Δ^4-ketosteroid pentru sinteza de androgeni (7) (11) (13) (15).

Figura 1

Mecanismul steroidogenic în celulele H295R



Notă:

Enzimele sunt cu caractere italice, hormonii sunt cu caractere îngroșate și săgețile indică direcția de sinteză. Fundalul gri indică mecanisme/produse corticosteroide. Mecanismele/produsele steroide sexuale sunt încercuite. CYP = citocrom P450; HSD = dehidrogenaza hidroxisteroidului; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Linia de celule adenocarcinom umane H295R este un model *in vitro* util pentru investigarea efectelor asupra sintezei de hormoni steroizi (2) (7) (8) (9) (10). Linia de celule H295R exprimă gene care codifică pentru toate enzimele cheie pentru steroidogeneză precizate mai sus (11) (15) (figura 1). Aceasta este o proprietate unică, întrucât expresia *in vivo* a acestor gene este țesutul și este specifică etapei de dezvoltare, iar, de regulă, nu există un singur țesut sau o etapă de dezvoltare care să exprime toate genele implicate în steroidogeneză (2). Celulele H295R au caracteristicile fiziologice ale celulelor adrenale fetale umane nediferențiate zonal (11). Celulele reprezintă un sistem unic *in vitro* în care acestea au capacitatea de a produce toți hormonii steroizi găsiți în cortexul adrenal și gonade la adult, permițând testarea efectelor asupra sintezei de corticosteroizi și producerea de hormoni steroizi sexuali, cum ar fi androgeni și estrogeni, deși testul a fost validat

▼**M5**

doar pentru a detecta T și E2. Modificările înregistrate de sistemul de testare sub formă de alterare la nivelul producerii de T și E2 pot fi rezultatul unei multitudini de interacțiuni diferite ale substanțelor chimice de testat cu funcțiile steroidogene care sunt exprimate de celulele H295R. Acestea includ modularea expresiei, a sintezei sau a funcției enzimelor implicate în producerea, transformarea sau eliminarea hormonilor steroizi (12) (13) (14). Inhibarea producției de hormoni se poate datora legării concomitente de o enzimă din mecanism, impactului asupra unor cofactori precum NADPH (nicotinamida adenin dinucleotid fosfat) și AMP ciclic (adenozin monofosfat ciclic) și/sau creșterii metabolismului steroizilor sau eliminării expresiei genice a anumitor enzime implicate în steroidogeneză. În timp ce inhibarea poate fi o funcție a proceselor implicate direct sau indirect de producția de hormoni, inducția este, de regulă, de natură indirectă, de exemplu, prin afectarea unor cofactori, cum ar fi NADPH și AMP ciclic (cum este cazul forskolinului), scăderea metabolismului steroizilor (13) și reglarea în sens ascendent a expresiei steroidogenice a genei.

9. Testul H295R are mai multe avantaje:

— permite detectarea creșterilor și a scăderilor la nivelul producției de T și E2;

— permite evaluare directă a impactului potențial al unei substanțe chimice asupra viabilității/citotoxicității celulare. Aceasta este o caracteristică importantă, deoarece permite discriminarea între efectele determinate de citotoxicitate de cele determinate de interacțiunea directă a substanțelor chimice cu mecanismele steroidogenice, ceea ce nu este posibil în sisteme de explanturi de țesut care constau în mai multe tipuri de celule de diferite niveluri de sensibilitate și funcționalități;

— nu implică utilizarea animalelor;

— linia de celule H295R este disponibilă în comerț.

10. Principalele limitări ale testului sunt următoarele:

— capacitatea sa metabolică este necunoscută, dar probabil destul de limitată; prin urmare, substanțele chimice care trebuie să fie activate metabolic vor fi probabil ratate în cadrul testului;

— fiind derivat din țesut adrenal, H295R posedă enzimele capabile să producă gluco- și mineralocorticoizi, precum și hormoni sexuali; astfel, efectele asupra producției de gluco- și mineralocorticoizi ar putea influența nivelurile de T și E2 observate în test;

— nu măsoară DHT și, prin urmare, nu este de așteptat să detecteze substanțele chimice care împiedică 5α-reductaza, caz în care poate fi utilizat testul Hershberger (16);

— testul H295R nu va identifica substanțele chimice care interferează cu steroidogeneza prin afectarea axului hipotalamic-pituitar-gonadal (HPG), întrucât acest aspect poate fi studiat doar la animale intacte.

Principiul testului

11. Scopul testului este de a detecta substanțele chimice care afectează producția de T și E2. T este, de asemenea, un intermediar în mecanismul de producere a E2. Testul poate detecta substanțele chimice care, de regulă, inhibă sau induc enzimele implicate în steroidogeneză.

▼M5

12. Testul se desfășoară în mod normal în condiții standard de cultură a celulelor pe plăci de cultură cu 24 de godeuri. Alternativ, se pot utiliza alte dimensiuni de plăci pentru efectuarea testului; cu toate acestea, condițiile de semănare și experimentale trebuie ajustate în consecință pentru a menține aderarea la criteriile de performanță.

13. După o perioadă de aclimatizare de 24 de ore în plăci cu godeuri multiple, celulele se expun timp de 48 de ore la șapte concentrații ale substanței chimice de testat în cel puțin trei exemplare. Solventul, precum și un inhibitor și un inductor de producție de hormoni cunoscuți sunt utilizați la o concentrație fixă, ca martori negativi și pozitivi. La sfârșitul perioadei de expunere, mediul este îndepărtat din fiecare godeu. Viabilitatea celulară din fiecare godeu este analizată imediat după îndepărtarea mediului. Concentrațiile de hormoni din mediu se pot măsura utilizând diverse metode, inclusiv truse de măsurare a nivelurilor de hormoni disponibile în comerț și/sau tehnici instrumentale precum cromatografia lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS). Datele sunt exprimate ca multiplu de schimbare în raport cu martorul pentru solvent și concentrația cea mai mică cu efect observat (CMEO). În cazul în care testul este negativ, cea mai mare concentrație testată este raportată ca fiind concentrația fără efect observat (CFEO). Concluziile cu privire la capacitatea unei substanțe chimice de a afecta steroidogeneza trebuie să se bazeze pe cel puțin două serii de teste independente. Primul test aplicat poate funcționa ca un test de identificare a intervalului cu ajustare ulterioară a concentrațiilor pentru testele 2 și 3, dacă este cazul, în cazul în care există probleme de solubilitate sau de citotoxicitate sau activitatea substanței chimice pare a fi la sfârșitul intervalului de concentrații testate.

PROCEDURA DE CULTIVARE

Linie de celule

14. Celulele NCI-H295R sunt disponibile comercial de la American Type Culture Collections (ATCC), la semnarea unui acord de transfer de material (MTA) ([1]).

Introducere

15. Datorită schimbărilor intervenite la nivelul capacității celulelor de producție de E2 la îmbătrânire/reînsămânțare (2), celulele se cultivă urmând un protocol specific înainte ca acestea să fie utilizate și se notează numărul de reînsămânțări de când celulele au fost decongelate, precum și numărul reînsămânțării la care celulele au fost congelate și introduse în azot lichid pentru stocare. Primul număr indică numărul curent de reînsămânțare al celulelor și cel de-al doilea număr indică numărul de reînsămânțare la care celulele au fost congelate și stocate. De exemplu, celulele care au fost congelate după reînsămânțarea cinci și dezghețate, iar ulterior au fost separate de trei ori (4 reînsămânțări, numărând celulele proaspăt decongelate ca reînsămânțarea 1) după ce au fost cultivate din nou ar fi etichetate drept reînsămânțarea 4.5. Un exemplu de sistem de numerotare este ilustrat în apendicele I din raportul de validare (4).

16. Se utilizează mediul stoc ca bază pentru mediile de completare și de congelare. Mediul de completare este o componentă necesară pentru cultivarea celulelor. Mediul de congelare este conceput anume pentru a permite congelarea celulelor fără impact asupra acestora, pentru stocare pe termen lung. Înainte de utilizare, Nu-serum [sau un ser comparabil ca proprietăți, care s-a demonstrat că produce date care satisfac performanța testelor și cerințele de control al calității (CC)], care este un element constitutiv al mediilor de completare, trebuie analizat pentru identificarea concentrațiilor de fond T și E2. Prepararea soluțiilor este descrisă în apendicele II la raportul de validare (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, disponibil la http://www.lgcstandards-atcc.org/

▼M5

17. După inițierea unei culturi de celule H295R pornind de la un lot inițial ATCC, celulele sunt cultivate pentru cinci însămânțări (și anume, celulele sunt separate de 4 ori). Celulele de însămânțare 5 sunt ulterior congelate în azot lichid pentru stocare. Înainte de congelarea celulelor, se aplică un eșantion de celule anterioare de reînsămânțarea 4 pe o placă CC (a se vedea punctele 36 și 37) pentru a verifica dacă producția bazală de hormoni și răspunsul la substanțele martor pozitive îndeplinesc criteriile de control ale testului calității, astfel cum sunt definite în tabelul 5.

18. Celulele H295R trebuie să fie cultivate, congelate și stocate în azot lichid pentru a se asigura că există întotdeauna celule de reînsămânțarea/vârsta corespunzătoare disponibile pentru cultivare și utilizare. Numărul maxim de însămânțări după luarea unui lot nou ([1]) sau congelat ([2]) de celule în cultură care este acceptabil pentru utilizare în testul H295R nu trebuie să depășească 10. De exemplu, însămânțările acceptabile pentru culturile de celule dintr-un lot congelat la reînsămânțarea 5 ar urma să fie de 4.5 până la 10.5. Pentru inițierea celulelor din loturile congelate, se respectă procedura descrisă la punctul (19). Celulele se cultivă pentru cel puțin patru (4) însămânțări suplimentare (reînsămânțarea 4.5) înainte de a fi utilizate în test.

Celulele de plecare din rezerva congelată

19. Procedura de inițiere a celulelor din rezerva congelată se utilizează atunci când un nou lot de celule este scos din depozitul de azot lichid pentru cultivare și testare. Detaliile procedurii sunt prevăzute în apendicele III la raportul de validare (4). Celulele se extrag din depozitul de azot lichid, se decongelează rapid, se introduc într-un mediu de completare într-un tub de centrifugă, sunt centrifugate la temperatura camerei, resuspendate în mediu de completare și transferate într-o balon de cultură. Mediul trebuie să fie schimbat în ziua următoare. Celulele H295R sunt cultivate într-un incubator la 37 °C în atmosfera de aer cu 5 % CO_2 și mediul este reînnoit de 2-3 ori pe săptămână. Atunci când celulele sunt aproximativ 85-90 % confluente, acestea trebuie să fie divizate. Divizarea celulelor este necesară pentru a se asigura sănătatea și creșterea celulelor și pentru a păstra celule pentru efectuarea de bioteste. Celulele sunt clătite de trei ori cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS, fără Ca^{2+} $Mg^{2+.}$) și se eliberează din balonul de cultură prin adăugarea unei enzime de detașare adecvate, de exemplu, tripsina, în PBS (fără Ca^{2+} Mg^{2+}). Imediat ce celulele se desprind de balonul de cultură, acțiunea enzimei ar trebui să fie oprită prin adăugarea unui mediu de completare la un raport de 3 × volumul utilizat pentru tratamentul enzimatic. Celulele sunt introduse într-un tub de centrifugă, centrifugate la temperatura camerei, supernatantul se elimină, iar extractul concentrat de celule se resuspendă în mediu de completare. Cantitatea corespunzătoare de soluție de celule se introduce într-un nou vas de cultură. Cantitatea de soluție de celule se ajustează astfel încât celulele să fie confluente în 5-7 zile. Raportul recomandat de sub-cultivare este de 1: 3 și 1: 4. Placa se etichetează cu atenție. În această etapă celulele sunt gata pentru a fi utilizate la testare și celulele suplimentare trebuie să fie congelate în azot lichid, astfel cum se specifică la punctul 20.

([1]) „Lot nou” înseamnă un nou lot de celule primit de la ATCC.

([2]) „Lot congelat” înseamnă celulele care au fost cultivate anterior și ulterior congelate la un laborator altul decât ATCC.

▼M5

Congelarea celulelor H 295R (prepararea celulelor pentru stocare în azot lichid)

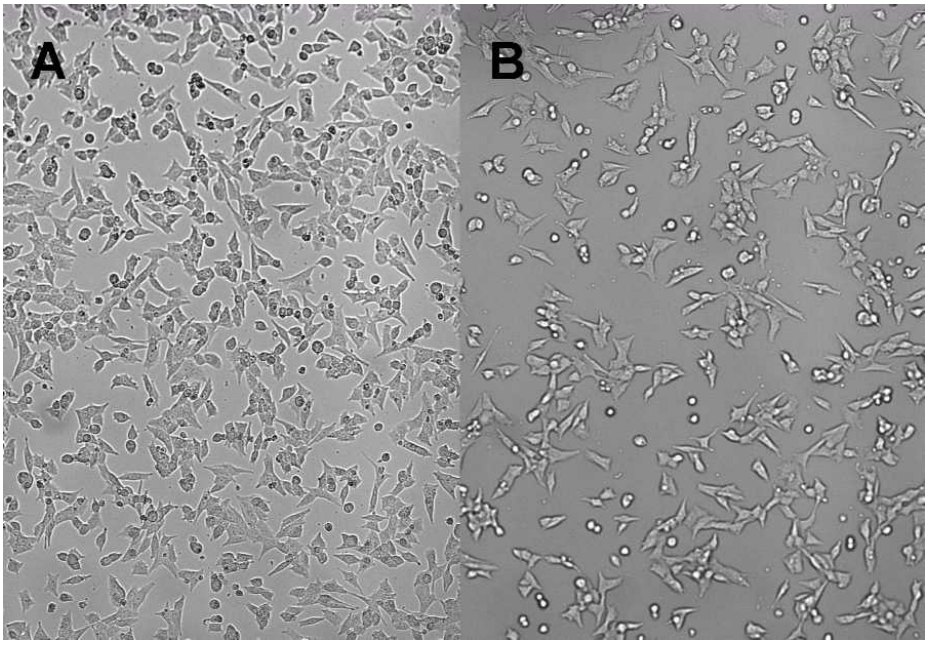
20. Pentru a prepara celulele H 295R pentru congelare, procedura descrisă mai sus pentru separarea celulelor trebuie urmată până la treapta pentru resuspendarea concentratului de celule din partea de jos a tubului de centrifugare. În această etapă, concentratul de celule se re-resuspendă în mediul de congelare. Soluția este transferată într-un flacon criogenic, etichetat în mod corespunzător și congelat la – 80°C timp de 24 h, după care flaconul de criogenie este transferat în azot lichid pentru stocare. Detaliile procedurii sunt prevăzute în apendicele III la raportul de validare (4).

Plasarea pe plăci și preincubarea celulelor pentru testare

21. Numărul de plăci cu 24 de godeuri, preparate astfel cum s-a specificat la punctul 19, care vor fi necesare depinde de numărul de substanțe chimice care urmează să fie testate și de confluența celulelor în vasele de cultură. Ca regulă generală, un balon de cultură (75 cm^2) cu 80-90 % celule confluente va furniza suficiente celule pentru una până la 1,5 plăci (cu 24 de godeuri), la o densitate țintă de 200 000 până la 300 000 celule/ml de mediu care rezultă în aproximativ 50-60 % confluență în godeuri la 24 de ore (figura 2). Aceasta este, în mod normal, densitatea celulară optimă pentru producția de hormoni în cadrul testului. La densități mai mari, modelele de producție ale T și E2 se modifică. Înainte de a efectua testul prima dată, se recomandă să se testeze diferite densități de însămânțare între 200 000 și 300 000 celule/ml și se recomandă selectarea densității care rezultă într-o confluență de 50-60 % în godeu la 24 de ore pentru experiențe suplimentare.

Figura 2

Fotomicrografie a celulelor H295R la o densitate de însămânțare de 50 % într-o placă de cultură cu 24 de godeuri și preluate la 24 de ore la marginea (A) și în centrul (B) al unui godeu.



22. Mediul este pipetat din balonul de cultură, iar celulele sunt spălate de 3 ori cu PBS sterilă (fără $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Se adaugă soluție enzimatică (în PBS) pentru desprinderea celulelor de balonul de cultură. După o perioadă adecvată pentru detașarea celulelor, acțiunea enzimei trebuie să fie oprită prin adăugarea unui mediu de completare într-un raport de 3× volumul

▼M5

utilizat pentru tratamentul enzimatic. Celulele sunt introduse într-un tub de centrifugă, centrifugate la temperatura camerei, supernatantul se elimină, iar extractul concentrat de celule se resuspendă în mediu de completare. Densitatea celulară se calculează utilizând, de exemplu, un hemocitometru sau un contor de celule. Soluția de celule se diluează până la densitatea dorită pentru placare și este amestecată cu atenție, pentru a asigura densitatea celulară omogenă. Celulele sunt dispuse pe placă cu 1 ml soluție de celule/godeu, iar plăcile și godeurile se etichetează. Plăcile însămânțate se incubează la 37 °C în atmosferă de aer cu sub 5 % CO_2 timp de 24 de ore pentru a permite celulelor să se ataşeze la godeuri.

CERINȚE DE CONTROL AL CALITĂȚII

23. Este esențial ca în timpul administrării să se furnizeze volumele exacte ale soluțiilor și ale eșantioanelor în godeuri, întrucât volumele determină concentrațiile utilizate în calculele de analiză a rezultatelor.

24. Înainte de a iniția cultura celulară și testarea ulterioară, fiecare laborator trebuie să demonstreze sensibilitatea sistemului său de măsurare a hormonilor (punctele 29-31).

25. În cazul în care se vor utiliza teste de măsurare a hormonilor pe bază de anticorpi, substanțele chimice supuse testului trebuie analizate pentru a identifica potențialul acestora de a interfera cu sistemul de măsurare utilizat pentru a cuantifica T și E2, astfel cum se indică la punctul 32, înainte de începerea testării.

26. DMSO este solventul recomandat pentru test. Dacă se utilizează un alt solvent, trebuie să se determine următoarele:

— solubilitatea substanței chimice de testat, forskolin și procloraz în solvent; și

— citotoxicitatea în funcție de concentrația de solvent.

Concentrația maximă admisibilă a solventului se recomandă să nu depășească o diluție 10 × din cea mai mică concentrație citotoxică a solventului.

27. Înainte de a efectua testarea pentru prima dată, laboratorul trebuie să efectueze un experiment de calificare care să demonstreze faptul că acesta este în măsură să mențină și să obțină culturile celulare corespunzătoare și condițiile experimentale necesare pentru analize chimice, astfel cum se specifică la punctele 33-35.

28. La începerea testării prin utilizarea unui nou lot, trebuie să se realizeze o placă de control înainte de a utiliza un nou lot de celule pentru a evalua performanța celulelor conform descrierii de la punctele 36 și 37.

Performanța sistemului de măsurare a hormonilor

Sensibilitatea, exactitatea, precizia și trans-reactivitatea metodei cu matrice eșantion

29. Fiecare laborator poate utiliza un sistem de măsurare a hormonilor la alegerea sa pentru analiza producției de T și E2 de către celulele H295R, cu condiția ca acesta să îndeplinească criteriile de performanță, inclusiv limita de cuantificare (LC). Nominal, acestea sunt de 100 pg/ml pentru T și de 10 pg/ml pentru E2, valori care se bazează pe nivelurile bazale ale hormonilor observate în studiile de validare. Cu toate acestea, niveluri mai mari sau mai mici pot fi adecvate, în funcție de nivelurile bazale ale hormonilor înregistrate în laboratorul în care se efectuează studiul. Înainte de inițierea plăcii CC și a ciclurilor de teste, laboratorul trebuie să demonstreze că analiza

▼M5

hormonului de utilizat poate măsura concentrațiile de hormon în mediul de completare cu suficientă acuratețe și precizie, pentru a se îndeplini criteriile CC prevăzute în tabelele 1 și 5, analizând mediul de completare la care s-a adăugat un martor hormon intern. La mediul de completare se adaugă cel puțin trei concentrații din fiecare hormon (de exemplu, 100, 500 și 2 500 pg/ml de T; 10, 50 și 250 pg/ml de E2; sau se pot utiliza concentrațiile cele mai mici posibile bazate pe limitele de detectare ale sistemul ales de măsurare a hormonilor pentru cele mai mici variabilități ale concentrației de T și E2) și se analizează. Concentrațiile măsurate ale hormonilor în eșantioanele neextrase trebuie să fie în limita a 30 % din concentrațiile nominale, iar diferențele între măsurătorile duble pentru aceeași probă nu trebuie să depășească 25 % (a se vedea, de asemenea, tabelul 8 pentru noi criterii CC). În cazul în care sunt îndeplinite criteriile CC, se presupune că analiza testului selectat pentru măsurarea hormonilor este suficient de precisă și nu provoacă o reacție încrucișată cu componentele din mediu (matricea eșantion), astfel încât să fie preconizată o influență semnificativă asupra rezultatului testului. În acest caz, nu este necesară o extracție de eșantioane înainte de măsurarea hormonilor.

30. În cazul în care nu sunt îndeplinite criteriile CC din tabelele 1 și 8, poate apărea un important efect de matrice și trebuie să se efectueze un experiment cu mediu extras contaminat. Un exemplu de procedură de extracție este descris în apendicele II la raportul de validare (4). Măsurarea concentrațiilor de hormoni în eșantioanele extrase se efectuează în trei exemplare ([1]). În cazul în care se poate dovedi că, după extracție, componentele mediului nu interferează cu metoda de depistare a hormonilor, astfel cum se definește în criteriile CC, orice alte experimente trebuie să se efectueze cu eșantioane extrase. În cazul în care criteriile CC nu pot fi îndeplinite după extragere, sistemul utilizat pentru măsurarea hormonilor nu este adecvat pentru scopul testului de steroidogeneză H295R și trebuie să se utilizeze o altă metodă de detectare a hormonilor.

Curba standard

31. Concentrațiile de hormon ale probelor martor pentru solvent (MS) trebuie să se situeze în porțiunea liniară a curbei standard. De preferință, valorile MS ar trebui să fie în apropierea centrului porțiunii liniare pentru a garanta că se poate măsura inducerea și inhibarea sintezei de hormoni. Diluțiile de mediu (sau extras) de măsurat se selecționează în consecință. Relația liniară se determină printr-o abordare statistică adecvată.

Interferența substanței de testat

32. În cazul în care se vor utiliza teste pe bază de anticorpi, cum ar fi testul de absorbție imunoenzimatică ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) și testele de radioimunodozare (Radio-Immuno Assays, RIA) pentru a măsura valorile hormonilor, fiecare substanță chimică trebuie să fie testată pentru o posibilă interferență cu sistemul de măsurare a hormonilor care va fi utilizat înainte de inițierea efectivă a substanțelor chimice [apendicele III la raportul de validare (4)], întrucât unele substanțe chimice pot interfera cu testele (17). Dacă apare interferența, și anume, ≥ 20 % din producția bazală de hormoni pentru T și/sau E2, astfel cum este stabilită de analiza hormonilor, testul de stabilire a interferenței asupra analizei hormonilor chimici [astfel cum este descris în apendicele III la raportul de validare (4), secțiunea 5.0] ar trebui să se aplice la toate diluțiile de soluție stoc ale substanței chimice testate pentru a identifica doza prag la care are loc o interferență semnificativă (≥ 20 %). În cazul în care interferența nu depășește 30 %, rezultatele pot fi corectate ținând cont de interferență. În

([1]) *Notă:* În cazul în care este necesar, se efectuează trei măsurători identice pentru fiecare extract. Fiecare eșantion va fi extras doar o singură dată.

▼M5

cazul în care interferența depășește 30 %, datele nu sunt valabile și datele la concentrațiile respective trebuie să fie eliminate. În cazul în care are loc o interferență semnificativă a substanței chimice de testat cu un sistem de măsurare a hormonilor la nivelul mai multor concentrații necitotoxice, trebuie utilizat un alt sistem de măsurare a hormonilor. În vederea evitării interferenței unor substanțe chimice contaminante, se recomandă ca hormonii să fie extrași din mediu utilizând un solvent adecvat, metodele posibile putând fi consultate în raportul de validare (4).

Tabelul 1

Criterii de performanță pentru sistemele de măsurare a hormonilor

Parametru	Criteriu
Sensibilitatea metodei de măsurare	Limita de cuantificare (LC) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Eficiența extracției hormonilor (numai în cazul în care extracția este necesară)	Ratele de recuperare medii (pe baza a trei măsurători duplicate) pentru cantitățile de hormoni îmbogățite nu trebuie să se abată cu mai mult de 30 % de la cantitatea care a fost adăugată.
Interferența substanței (numai sistemele bazate pe anticorpi)	Nu ar trebui să se manifeste nicio trans-reactivitate substanțială (≥ 30 % din producția bazală de hormoni a hormonului respectiv) cu oricare dintre hormonii produși de celule [b] [c]

[a] *Notă:* Limitele metodei de măsurare se bazează pe valorile bazale ale producției de hormoni prevăzute în tabelul 5 și sunt bazate pe performanță. Dacă se poate obține o producție mai mare de hormoni, limita poate fi mai ridicată.

[b] Unii anticorpi T și E2 pot reacționa încrucișat cu androstendion și, respectiv, estron la un procent mai mare. În astfel de cazuri, nu se pot stabili cu precizie efectele asupra 17β-HSD. Cu toate acestea, datele pot furniza în continuare informații utile referitoare la efectele asupra producției de estrogen sau androgen în general. În astfel de cazuri, datele se exprimă ca răspunsuri de estrogen și androgen, mai degrabă decât E2 și T.

[c] Acestea includ: colesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxicorticosteron, corticosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoxicortizol, cortizol, DHEA, androstendion, estron.

Testul de competență a laboratorului

33. Înaintea testării unor substanțe chimice necunoscute, un laborator trebuie să demonstreze că poate să obțină și să mențină o cultură de celule adecvată și condițiile de testare necesare pentru desfășurarea cu succes a testului de competență a laboratorului. Întrucât performanța unei analize este direct legată de personalul de laborator care efectuează testul, procedurile ar trebui să fie parțial repetate în cazul în care apare o modificare a personalului de laborator.

34. Testul de competență se va efectua în aceleași condiții enumerate la punctele 38-40, prin expunerea celulelor la 7 concentrații gradate de inductori și inhibitori puternici, moderați și slabi, precum și o substanță negativă (a se vedea tabelul 2). În mod specific, substanțele chimice de testat includ inductorul puternic forskolin (CAS nr. 66575-29-9); inhibitorul

▼M5

puternic procloraz (CAS nr. 67747-09-5); inductorul moderat atrazină (CAS nr. 1912-24-9); inhibitorul moderat aminoglutetimidă (CAS 125-84-8); inductorul slab (producție E2) și inhibitorul slab bisfenol A (producție T) (CAS nr. 80-05-7); și substanța chimică negativă gonadotropina corionică umană (HCG) (CAS nr. 9002-61-3) astfel cum se arată în tabelul 2. Se aplică plăci separate pentru toate substanțele chimice, utilizând formatul specificat în tabelul 6. O placă CC (tabelul 4, punctele 36-37) se include zilnic în testele pentru substanțele chimice de verificare.

Tabelul 2

Substanțe chimice de testat și concentrațiile de expunere

Substanțe chimice de verificare	Concentrațiile de testare [μM]
Procloraz	0 (a), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 (a), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazină	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimidă	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

(a) Martor (0) pentru solvent (DMSO), 1 μl DMSO/godeu.

Expunerea H295R la substanțele chimice de verificare trebuie realizată pe plăci de 24 de godeuri în timpul testului de competență a laboratorului. Stabilirea dozelor se realizează în μM pentru toate substanțele de testat. Dozele se administrează în DMSO la 0,1 % v/v în fiecare godeu. Toate concentrațiile trebuie să fie testate în trei godeuri duplicate (tabelul 6). Fiecare substanță chimică se testează pe plăci separate. O placă CC este inclusă în fiecare zi de desfășurare.

35. Analizele de viabilitate celulară și a hormonilor se desfășoară astfel cum se prevede la punctele 42-46. Valoarea prag (CMEO) și decizia de clasificare ar trebui să fie raportate și comparate cu valorile din tabelul 3. Datele sunt considerate acceptabile în cazul în care acestea îndeplinesc CFEO și deciziile de clasificare din tabelul 3.

Tabelul 3

Valorile prag (CMEO) și deciziile de clasificare a substanțelor chimice de testat

	CAS nr.	CMEO [μM]		Decizie de clasificare	
		T	E2	T	E2
Procloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ (a) (Inhibare)	+ (Inhibare)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Inducere)	+ (Inducere)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Inducere)	+ (Inducere)
Aminoglute-timida	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibare)	+ (Inhibare)

▼M5

	CAS nr.	CMEO [μM]		Decizie de clasificare	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibare)	+ (Inducere)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negativ	Negativ

([a]) +, pozitiv
n/a: nu se aplică deoarece nu apare nicio modificare după expunerea la concentrații necitotoxice de martor negativ.

Placa de control al calității

36. Placa de control al calității (CC) este utilizată pentru a verifica performanța celulelor H295R în conformitate cu condițiile standardului de cultivare și pentru a stabili o bază de date istorice privind concentrațiile de hormoni în martorii pentru solvent, martorii pozitivi și martorii negativi, precum și alte măsuri de control al calității în timp.

— performanța celulelor H295R trebuie să fie evaluată utilizând o placă CC pentru fiecare lot nou de la ATCC sau după utilizarea pentru prima dată a unei rezerve de celule congelată anterior, cu excepția cazului în care testul de competență a laboratorului (punctele 32-34) s-a efectuat pe lotul de celule respectiv;

— o placă CC oferă o evaluare completă a condițiilor de testare (de exemplu, viabilitate celulară, martori pentru solvent, martori pozitivi și negativi, precum și variabilitate intra- și intertest) pentru testarea de substanțe chimice și trebuie să facă parte din fiecare ciclu de test.

37. Testul CC este efectuat utilizând o placă cu 24 de godeuri și urmează aceleași proceduri de incubare, dozare, viabilitate/citotoxicitate celulară, extracție hormonală și analiză hormonală descrise la punctele 38-46 pentru testarea substanțelor chimice. Placa CC conține spații libere, martori pentru solvent și două concentrații ale unui inductor (forskolin, 1, 10 μM) și inhibitor cunoscut (procloraz, 0,1, 1 μM) al sintezei de E2 și T. În plus, în godeuri selectate se utilizează MeOH ca martor pozitiv pentru testul de viabilitate/citotoxicitate. În tabelul 4 se găsește o descriere detaliată a aspectului plăcii. În tabelul 5 sunt enumerate criteriile care trebuie îndeplinite cu privire la placa CC. Trebuie să se obțină producția minimă bazală de hormoni pentru T și E2 atât în martorul pentru solvent, cât și în godeurile libere.

Tabelul 4

Aspectul plăcii de control al calității pentru testarea competenței celulelor H295R neexpuse și a celulelor expuse la inhibitori (PRO = procloraz) și stimulatori cunoscuți (FOR = forskolin) ai producției de E2 și T. După încheierea experimentului de expunere și îndepărtarea mediului, se adaugă o soluție de metanol MeOH 70 % la toate godeurile pentru a servi ca martor pozitiv pentru citotoxicitate [a se vedea testul de citotoxicitate în apendicele III la raportul de validare (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	spațiu liber ([a])	spațiu liber ([a])	spațiu liber ([a])	spațiu liber ([a]) (+ MeOH) ([b])	spațiu liber ([a]) (+ MeOH) ([b])	spațiu liber ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

([a]) Celulele din godeurile libere primesc numai mediu (şi anume, fără solvent).
([b]) Metanolul (MeOH) se adaugă după încheierea expunerii, iar mediul este îndepărtat din godeurile respective.
([c]) Martor pentru solvent DMSO (1 µl/godeu).

Tabelul 5

Criterii de performanță pentru placa de control al calității

	T	E2
Producția bazală de hormoni în martorul pentru solvent (MS)	≥ 5 ori limita de cuantificare (LC)	≥ 2,5 ori limita de cuantificare (LC)
Inducere (10 µM forskolin)	≥ 1,5 ori MS	≥ 7,5 ori MS
Inhibare (1 µM proclonaraz)	≤ 0,5 ori MS	≤ 0,5 ori MS

PROCEDURA DE EXPUNERE LA SUBSTANȚE CHIMICE

38. Celulele preincubate sunt scoase din incubator (punctul 21) şi se verifică la microscop pentru a se asigura că sunt în stare bună (fixare, morfologie) înainte de dozare.

39. Celulele sunt plasate într-un dulap de biosecuritate, iar mediul de completare este eliminat şi înlocuit cu un nou mediu de completare (1 ml/godeu). DMSO este solventul preferat pentru prezenta metodă de testare. Cu toate acestea, în cazul în care există motive pentru a folosi alți solvenți, se prezintă justificarea ştiinţifică pentru aceasta. Celulele sunt expuse la substanța de testat prin adăugarea a 1 µl de soluție stoc corespunzătoare în DMSO [a se vedea apendicele II la raportul de validare (4)] per 1 ml de mediu de completare (volumul godeului). Aceasta conduce la o concentrație finală de 0,1 % DMSO în godeuri. Pentru a asigura amestecarea adecvată, se preferă, în general, ca soluția stoc corespunzătoare de substanță de testat din DMSO să fie amestecată cu mediu de completare, astfel încât să se obțină concentrația finală dorită pentru fiecare doză, iar amestecul se adaugă în fiecare godeu imediat după îndepărtarea mediului vechi. Dacă se utilizează această opțiune, concentrația de DMSO (0,1 %) trebuie să fie consecventă în toate godeurile. Godeurile care conțin cele mai mari două concentrații sunt evaluate vizual, cu ajutorul unui microscop stereoscopic, pentru a verifica formarea de precipitate sau aspectul tulbure ca o indicație a solubilității incomplete a substanței de testat. În cazul în care se observă astfel de condiții (formarea de precipitate, aspect tulbure), se examinează, de asemenea, godeurile care conțin următoarele concentrații mai mici (şi aşa mai departe), iar concentrațiile care nu sunt complet dizolvate în soluție urmează să fie excluse de la evaluare şi analiză suplimentară. Placa este pusă din nou în incubator la 37 °C în atmosferă de aer cu sub 5 % CO_2 timp de 48 ore. În tabelul 6 se prezintă aspectul plăcii substanței de testat. Stocurile 1-7 indică plasarea de doze din ce în ce mai mari ale substanței de testat.

▼M5

Tabelul 6

Schema dozării pentru expunerea celulelor H295R la substanțe chimice de testat într-o placă cu 24 de godeuri

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stoc 4	Stoc 4	Stoc 4
B	Stoc 1	Stoc1	Stoc 1	Stoc 5	Stoc 5	Stoc 5
C	Stoc 2	Stoc 2	Stoc 2	Stoc 6	Stoc 6	Stoc 6
D	Stoc 3	Stoc 3	Stoc 3	Stoc 7	Stoc 7	Stoc 7

40. După 48 ore de expunere, plăcile sunt scoase din incubator și fiecare godeu este verificat la microscop pentru a determina starea celulelor (fixare, morfologie, grad de confluență) și semne de citotoxicitate. Mediul din fiecare godeu este împărțit în două părți egale (aproximativ 490 µl fiecare) și este transferat în două flacoane separate etichetate corespunzător (de exemplu, o alicotă pentru a furniza un eșantion de rezervă pentru fiecare godeu). Pentru a preveni uscarea celulelor, mediul este înlăturat câte un rând sau o coloană o dată și se înlocuiește cu mediul pentru testul de viabilitate/citotoxicitate celulară. Dacă viabilitatea/citotoxicitatea celulară nu se măsoară imediat, se adaugă 200 µl PBS cu Ca^{2+} și Mg^{2+} la fiecare godeu. Mediile sunt congelate la – 80 °C până la prelucrarea ulterioară pentru analizarea concentrațiilor de hormoni (a se vedea punctele 44-46). În timp ce T și E2 în mediu păstrat la – 80 °C sunt, în general, stabili timp de cel puțin 3 de luni, stabilitatea hormonilor în timpul stocării trebuie documentată în fiecare laborator.

41. Imediat după înlăturarea mediului, se determină viabilitatea/citotoxicitatea celulară pentru fiecare placă de expunere.

Determinarea viabilității celulare

42. Un test de viabilitate/citotoxicitate a celulelor la alegere poate fi utilizat pentru a determina impactul potențial al substanței de testat asupra viabilității celulelor. Testul trebuie să poată furniza o măsură reală a procentului de celule viabile prezente într-un godeu sau trebuie să se demonstreze că aceasta este direct comparabilă cu (o funcție liniară din) testul celule vii/moarte (Live/Dead® Assay) [a se vedea apendicele III la raportul de validare (4)]. O altă analiză care s-a dovedit că funcționează la fel de bine este testul MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazoliu] (18). Evaluarea viabilității celulare prin metodele de mai sus reprezintă o măsurare relativă care nu prezintă neapărat relații liniare cu numărul absolut de celule dintr-un godeu. Prin urmare, analistul ar trebui să efectueze o evaluare vizuală paralelă subiectivă a fiecărui godeu, se fac fotografii digitale ale MS și primele două cele mai mari concentrații necitotoxice trebuie să fie prelevate și arhivate pentru a permite evaluări ulterioare ale densității celulare reale, dacă acest lucru este necesar. În cazul în care, prin inspecție vizuală sau astfel cum demonstrează testul de viabilitate/citotoxicitate, se pare că există o creștere a numărului de celule, creșterea aparentă trebuie să fie verificată. În cazul în care se confirmă o creștere a numărului de celule, acest lucru trebuie specificat în raportul testului. Viabilitatea celulară se exprimă în raport cu răspunsul mediu în MS, care se consideră a fi 100 % celule viabile, și se calculează în funcție de testul de viabilitate/citotoxicitate celulară care este utilizat. Pentru MTT, se poate utiliza următoarea formulă:

▼M5

% celule viabile = (răspuns în godeu – răspunsul mediu în godeuri tratate cu MeOH [= 100 % moarte]) ÷ (răspunsul mediu în godeuri MS – răspunsul mediu în godeuri tratate cu MeOH [= 100 % moarte])

43. Godeurile cu viabilitate mai mică de 80 % în raport cu viabilitatea medie în MS (= 100 %) nu ar trebui să fie incluse în analiza finală a datelor. Inhibarea steroidogenezei care se produce în prezența unui nivel de aproape 20 % citotoxicitate trebuie evaluată cu atenție pentru a se asigura că nu citotoxicitatea este cauza inhibării.

Analiza hormonilor

44. Fiecare laborator poate utiliza un sistem de măsurare a hormonilor la alegerea sa pentru analiza T și E2. Se pot utiliza părți alicote de rezervă de mediu de la fiecare grup de tratament pentru a prepara diluții pentru a aduce concentrația în partea liniară a curbei standard. Astfel cum s-a menționat la punctul 29, fiecare laborator trebuie să demonstreze conformitatea sistemului său de măsurare hormonală (de exemplu, ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) cu criteriile CC prin analizarea mediului de completare la care se adaugă un martor hormon intern înainte de a efectua testele CC sau testarea substanțelor chimice. Pentru a se asigura că niciuna dintre componentele sistemului de testare nu interferează cu măsurarea hormonilor, ar putea fi necesar ca hormonii să fie extrași din medii înainte de măsurarea acestora (a se vedea punctul 30 pentru condițiile în care o extracție este sau nu necesară). Se recomandă să se efectueze extracția urmând procedurile specificate în apendicele III la raportul de validare (4).

45. În cazul în care pentru măsurarea producției de hormoni se utilizează o trusă de testare comercială, analiza hormonală trebuie efectuată astfel cum se precizează în manualele furnizate de producătorul trusei de testare. Majoritatea producătorilor au o procedură unică prin care se efectuează analizele hormonale. Diluțiile de probe trebuie să fie ajustate astfel încât concentrațiile preconizate de hormoni la martorii pentru solvent să se afle în centrul intervalului liniar al curbei standard a testului individual [apendicele III la raportul de validare (4)]. Valorile care depășesc porțiunea liniară a curbei standard trebuie să fie respinse.

46. Concentrațiile hormonale finale sunt calculate după cum urmează:

Exemplu:

Extrase:	450 µl mediu
Reconstituite în:	250 µl tampon de analiză
Diluare în test:	10:1 (pentru a aduce eșantionul la intervalul liniar al curbei standard)
Concentrația de hormoni în test:	150 pg/ml (adaptat deja la concentrația per ml de probă testată)
Redresare:	89 %
Concentrația hormonală finală =	Concentrația de hormoni (per ml) ÷ recuperare) (factorul de diluție)
Concentrația hormonală finală =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Selecția concentrațiilor de testare

47. Ar trebui să se efectueze un minim de două serii de teste independente. Cu excepția cazului în care informații prealabile, cum ar fi informații cu privire la limitele de solubilitate sau citotoxicitate, oferă o bază pentru alegerea concentrațiilor de testare, se recomandă ca pentru testul inițial concentrațiile de testare să fie distanțate la intervale logaritmice de 10, 10^{-3} M fiind concentrația maximă. În cazul în care substanța chimică este solubilă și nu este citotoxică la niciuna dintre concentrațiile testate, iar primul test a fost negativ pentru toate concentrațiile, acest lucru trebuie să fie confirmat prin efectuarea încă a unui test în aceleași condiții în care s-a efectuat primul test (tabelul 7). În cazul în care rezultatele primului test sunt *neclare* (și anume, coeficientul de modificare este semnificativ statistic de la MS la o singură concentrație) sau pozitive (și anume, coeficientul de modificare la două sau mai multe concentrații adiacente este semnificativ statistic), testul trebuie repetat, astfel cum se indică în tabelul 7, prin rafinarea concentrațiilor de testare selectate. Concentrațiile de testare din ciclurile de teste doi și trei (dacă este cazul) trebuie să fie ajustate în funcție de rezultatele ciclului inițial de teste care au valori de o parte și de alta a concentrațiilor care au provocat un efect, utilizând o spațiere de concentrare de 1/2-log (de exemplu, dacă ciclul inițial de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM a condus la induceri la 1 și 10 μM, concentrațiile testate în al doilea ciclu de teste trebuie să fie de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), cu excepția cazului în care trebuie să se utilizeze concentrații mai mici pentru obține CMEO. În acest din urmă caz, în cel de-al doilea ciclu de teste se vor utiliza cel puțin cinci concentrații sub cea mai mică concentrație testată în primul ciclu de teste, utilizând o scară de 1/2-log. În cazul în care al doilea ciclu de teste nu confirmă primul ciclu de teste (și anume, nu apare o semnificație statistică la concentrația testată anterior pozitiv ± 1 variație de concentrație), se va efectua un al treilea experiment utilizând condițiile inițiale de testare. Rezultatele neclare din primul ciclu de teste se consideră negative în cazul în care efectul observat nu a putut fi confirmat în oricare dintre cele două cicluri ulterioare. Rezultatele neclare sunt considerate răspunsuri (efect) pozitive atunci când răspunsul poate fi confirmat în cel puțin încă un ciclu de teste cu un interval de creștere a concentrației de ± 1 (a se vedea punctul 55 pentru procedura de interpretare a datelor].

Tabelul 7

Matrice de decizii pentru posibile scenarii de rezultat

Ciclul 1	Ciclul 2		Ciclul 3		Decizie	
Scenariu	Decizie	Scenariu	Decizie	Scenariu	Pozitiv	Negativ
Negativ	De confirmat ([a])	Negativ	Stop			X
Negativ	De confirmat ([a])	Pozitiv	De perfecționat ([b])	Negativ		X
Neclar ([c])	De perfecționat ([b])	Negativ	De confirmat ([a])	Negativ		X
Neclar ([c])	De perfecționat ([b])	Negativ	De confirmat ([a])	Pozitiv	X	
Neclar ([c])	De perfecționat ([b])	Pozitiv			X	
Pozitiv	De perfecționat ([b])	Negativ	De confirmat ([a])	Pozitiv	X	

▼M5

Ciclul 1	Ciclul 2		Ciclul 3		Decizie	
Scenariu	Decizie	Scenariu	Decizie	Scenariu	Pozitiv	Negativ
Negativ	De confirmat ([a])	Pozitiv	De perfecționat ([b])	Pozitiv	X	
Pozitiv	De perfecționat ([b])	Pozitiv	Stop		X	

([a]) Se confirmă ciclul anterior utilizând același concept experimental.
([b]) Se reia testul la o spațiere a concentrației de 1/2-log (valorile de o parte și de alta a concentrației care a testat în mod semnificativ diferit în experimentul precedent).
([c]) Coeficientul de modificare la o singură concentrație este semnificativ diferit statistic de MS.

Controlul de calitate al plăcii de testare

48. În plus față de respectarea criteriilor pentru placa CC, trebuie să se respecte și alte criterii de calitate, care se referă la variația acceptabilă între godeuri duplicate, experimente duplicate, liniaritatea și sensibilitatea sistemelor de măsurare hormonale, variabilitatea între măsurătorile hormonale duplicate ale aceleiași probe și recuperarea procentuală de vârfuri hormonale după extracția mediului (dacă este cazul; a se vedea punctul 30 în ceea ce privește cerințele de extracție), acestea fiind prezentate în tabelul 8. Datele trebuie să se încadreze în intervalele acceptabile definite pentru fiecare parametru care urmează să fie luat în considerare pentru o evaluare suplimentară. În cazul în care criteriile nu sunt îndeplinite, tabelul trebuie să menționeze că nu s-au îndeplinit criteriile de CC în eșantionul respectiv, iar eșantionul se analizează din nou sau se elimină din setul de date.

Tabelul 8

Intervale și/sau variație acceptabile (%) pentru parametrii plăcii de testare a testului H295R

(LC: limita de cuantificare a sistemului de măsurare hormonală. CV: coeficient de variație; MS: martor pentru solvent; DPM: dezintegrări pe minut)

	Comparație între	T	E2
Producția hormonală bazală în MS	Coeficient mai mare decât LC	≥ 5 ori	≥ 2,5 ori
Experimente de expunere — CV pentru aceeași placă pentru MS (godeuri duplicate)	Concentrații absolute	≤ 30 %	≤ 30 %
Experimente de expunere — CV între plăci pentru MS (experimente duplicate)	Coeficient de modificare	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistemul de măsurare hormonală — sensibilitate	Scădere a coeficientului detectabilă în raport cu MS	≥ 5 ori	≥ 2,5 ori
Sistemul de măsurare hormonală — CV pentru măsurare duplicată pentru MS ([a])	Concentrații absolute	≤ 25 %	≤ 25 %
Extracția mediului — recuperarea standardului intern 3H (dacă este cazul)	DPM	≥ 65 % nominal	

([a]) Se referă la măsurări duplicate ale aceleiași probe.

▼M5

ANALIZA DATELOR ŞI RAPORTARE

Analiza datelor

49. Pentru a evalua creşterea/descreşterea relativă la nivelul producţiei hormonale modificate chimic, rezultatele ar trebui să fie normalizate la valoarea medie MS a fiecărei plăci de testare, iar rezultatele ar trebui să fie exprimate ca modificări faţă de MS în fiecare placă de testare. Toate datele sunt exprimate ca medie ± 1 deviaţie standard (DS).

50. Numai datele privind hormonii din godeurile unde citotoxicitatea a fost sub 20 % ar trebui să fie incluse în analiza datelor. Modificările relative se calculează după cum urmează:

Schimbare relativă = (concentraţia de hormoni din fiecare godeu) ÷ (concentraţia de hormoni medie în toate godeurile martor pentru solvent).

51. În cazul în care, prin inspectarea vizuală a godeului sau astfel cum demonstrează testul de viabilitate/citotoxicitate descris la punctul 42, se pare că nu există o creştere a numărului de celule, creşterea aparentă trebuie să fie confirmată. În cazul în care o creştere a numărului de celule este confirmată, acest lucru trebuie specificat în raportul de testare.

52. Înainte de a efectua analize statistice, trebuie să se evalueze ipotezele de normalitate şi de omogenitate a varianţei. Normalitatea se evaluează utilizând reprezentări grafice standard ale probabilităţilor sau alte metode statistice adecvate (de exemplu, testul Shapiro-Wilk). În cazul în care datele (coeficientul de modificare) nu au o distribuţie normală, se poate încerca transformarea datelor pentru a aproxima o distribuţie normală. Dacă datele prezintă o distribuţie normală sau aproximează o distribuţie normală, trebuie să se analizeze diferenţele dintre grupurile de concentraţie a substanţei chimice şi MS cu ajutorul unui test parametric (de exemplu, testul Dunnett), *concentraţia* fiind variabila independentă şi *răspunsul* (coeficientul de modificare) fiind variabila dependentă. În cazul în care datele nu au o distribuţie normală, se utilizează un test non-parametric adecvat (de exemplu, testul de clasificare mulţi-unul Kruskal Wallis, Steel). Diferenţele sunt considerate semnificative la $p \leq 0{,}05$. Evaluările statistice sunt efectuate pe baza valorilor medii pentru fiecare godeu care reprezintă puncte de reper duplicate independent. Se preconizează că, datorită spaţierii mari a dozelor în primul ciclu de teste (scară logaritmică $\log_{10}$), în multe cazuri nu va fi posibil să se descrie în mod clar relaţiile concentraţie-răspuns în care cele mai mari două doze se vor afla pe porţiunea liniară a curbei sigmoid. Prin urmare, pentru primul ciclu de teste sau alte seturi de date în care apare această situaţie (de exemplu, în cazul în care nu se poate estima o eficienţă maximă), se aplică statistici variabile fixe de tip I, astfel cum sunt descrise mai sus.

53. În cazul în care mai mult de două puncte de date se află pe porţiunea liniară a curbei şi se pot calcula eficacităţi maxime — se anticipează pentru unele dintre ciclurile secunde de teste care sunt efectuate utilizând o spaţiere semi-logaritmică a concentraţiilor de expunere — trebuie să se utilizeze un probit, logit sau alte modele de regresie corespunzătoare pentru a calcula concentraţii efective (de exemplu, EC_{50} şi EC_{20}).

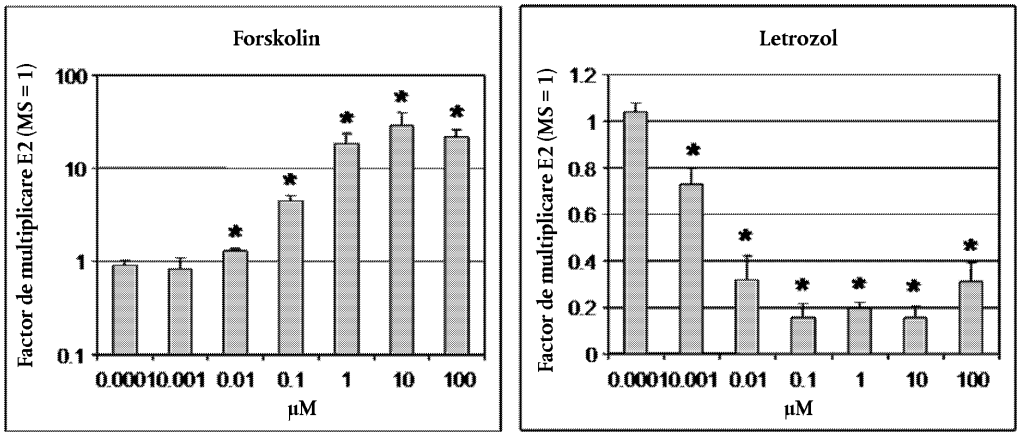
54. Rezultatele trebuie să fie prezentate atât în forme grafice (histograme care reprezintă DS medie ± 1), cât şi în tabele (CMEO/CFEO, direcţia efectului şi magnitudinea răspunsului maxim care face parte din porţiunea de date care prezintă o relaţie doză-răspuns) (pentru un exemplu, a se vedea figura 3). Evaluarea datelor este considerată valabilă doar în cazul în care aceasta s-a bazat pe cel puţin două cicluri de teste desfăşurate în mod independent. Un experiment sau un ciclu de teste este considerat independent în cazul în care acesta a fost executat la o altă dată cu ajutorul unui nou set de soluţii şi martori. Intervalul de concentraţii utilizat în ciclurile de teste 2 şi 3 (în cazul în care este necesar) se poate adapta pe baza rezultatelor ciclului 1 pentru o mai bună definire a intervalului doză-efect care include CMEO (a se vedea punctul 47).

▼M5

Figura 3

Exemplu de prezentare și evaluare a datelor obținute pe durata derulării testului H295R în format grafic și de tabel

[Asteriscurile indică diferențe semnificative statistic față de martorul pentru solvent *($p < 0,05$)*. CMEO: concentrația cea mai mică cu efect observabil; Modificare maximă: magnitudinea maximă a răspunsului observat la orice concentrație în raport cu răspunsul mediu al MS (= 1)]



Substanța chimică	CMEO	Modificare maximă
Forskolin	0,01	0,15 ori
Letrozol	0,001	29 ori

Procedura de interpretare a datelor

55. O substanță chimică de testat se consideră a fi pozitivă în cazul în care coeficientul de inducție este diferit din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$) față de martorul pentru solvent la două concentrații adiacente în cel puțin două cicluri independente de teste (tabelul 7). O substanță chimică de testat se consideră a fi negativă în urma a două cicluri independente de teste cu rezultat negativ, sau în urma a trei cicluri care cuprind două cicluri de teste negative și un ciclu neclar sau pozitiv. În cazul în care datele obținute în trei experimente independente nu îndeplinesc criteriile de decizie enumerate în tabelul 7, rezultatele experimentale nu sunt interpretabile. Rezultatele la concentrații care depășesc limitele de solubilitate sau la concentrații citotoxice nu trebuie să fie incluse în interpretarea rezultatelor.

Raportul de testare

56. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Unitatea de testare

— denumirea unității, localizarea;

— directorul studiului și alți membri ai personalului și responsabilitățile acestora în cadrul studiului;

— datele de început și de sfârșit ale studiului.

▼M5

Substanța chimică de testat, reactivi și martori

— identitatea (nume/nr. CAS, după caz), sursa, numărul lotului, puritatea, furnizorul și caracterizarea substanței chimice de testat, reactivi și martori;

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanței de testat;

— condițiile de stocare și metoda și frecvența preparării substanțelor de testare, a reactivilor și a martorilor;

— stabilitatea substanței chimice de testat.

Celule

— sursa și tipul de celule;

— numărul de reînsămânțări (identificator de reînsămânțare celulară) ale celulelor utilizate în test;

— descrierea procedurilor de păstrare a culturilor de celule.

Cerințe înainte de testare (dacă este cazul)

— descrierea și rezultatele testului de interferență al testului hormon chimic;

— descrierea și rezultatele măsurătorilor eficienței de extracție a hormonilor;

— curbele standard și etalonare pentru toate testele analitice care trebuie efectuate;

— limitele de detecție pentru testele analitice selectate.

Condiții de testare

— compoziția mediilor de cultură;

— concentrația substanței de testat;

— densitatea celulară (concentrații celulare estimate sau măsurate la 24 de ore și la 48 de ore);

— solubilitatea substanței de testat (limita de solubilitate, în cazul în care este stabilită);

— durata și condițiile de incubație.

Rezultatele testului

— datele neprelucrate pentru fiecare godeu pentru martori și substanțele chimice de testat — fiecare măsură duplicată sub forma datelor originale furnizate de instrumentul utilizat pentru a măsura producția de hormoni (de exemplu, OD, unități de fluorescență, DPM etc.);

— validarea normalității sau explicațiile privind transformarea datelor;

— răspunsurile medii ± 1 SD pentru fiecare godeu măsurat;

— datele privind citotoxicitatea (concentrațiile de testare care au determinat citotoxicitate);

— confirmarea faptului că au fost îndeplinite cerințele de control al calității;

▼M5

— modificarea relativă în comparație cu martorul pentru solvent rectificat pentru citotoxicitate;

— un grafic care să indice modificarea relativă (coeficient de modificare) la fiecare concentrație, SD și semnificația statistică, astfel cum s-a precizat la punctele 4954.

Interpretarea datelor

— se aplică procedura de interpretare a datelor la rezultate și se discută observațiile.

Discuție

— Există indicații din studiu în ceea ce privește posibilitatea ca datele referitoare la T/E2 să fi fost influențate de efecte indirecte asupra mecanismelor gluco- și mineralocorticoizilor?

Concluzii

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23-30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Disponibil la [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Disponibil la: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Disponibil la: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78-89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

(16) Capitolul B.55 din prezenta anexă: Biotestul Hershberger la șobolani: un test de depistare pe termen scurt pentru substanțe cu proprietăți (anti)androgenice.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484492.

▼M5

Apendice

DEFINIȚII

Confluență înseamnă acoperirea sau proliferarea permisă celulelor pe sau în tot mediul de cultură.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec de substanțe.

CV înseamnă coeficientul de variație și este definit ca raportul dintre deviația standard a distribuției la media sa aritmetică.

CYP înseamnă mono-oxigenazele citocromului P450, o familie de gene și enzimele produse din acestea, care sunt implicate în cataliza unei largi varietăți de reacții biochimice, inclusiv sinteza și metabolismul hormonilor steroizi.

DPM înseamnă dezintegrări pe minut. Este vorba despre numărul atomilor dintr-o cantitate dată de materiale radioactive, care este detectată că s-ar fi dezintegrat într-un minut.

E2 înseamnă 17β-estradiol, cel mai important estrogen din sistemele mamiferelor.

Celulele H295R sunt celule adenocarcinom umane care au caracteristicile fiziologice ale celulelor adrenale fetale umane nediferențiate zonal și care exprimă toate enzimele implicate în steroidogeneză. Acestea sunt disponibile de la ATCC.

Mediul de congelare este utilizat pentru a congela și a stoca celulele congelate. Acesta se compune din mediu de stoc plus BD NuSerum și dimetilsulfoxid.

Interval liniar înseamnă intervalul în curba standard pentru un sistem de măsurare a hormonilor unde rezultatele sunt proporționale cu concentrația de analit prezent în probă.

LC înseamnă „limita de cuantificare” și este cea mai mică cantitate a unei substanțe chimice care poate fi distinsă de absența substanței respective (o valoare blanc) cuprinsă într-un interval de încredere declarat. În scopul prezentei metode, LC este definit, de regulă, de către producătorul sistemelor de testare, dacă nu se specifică altfel.

CMEO înseamnă concentrația cea mai mică cu efecte observate, cel mai scăzut nivel de concentrație la care răspunsul este diferit statistic de cel al martorului pentru solvent.

CFEO înseamnă concentrația fără efect observat, care este cea mai mare concentrație testată la care testul nu furnizează un răspuns pozitiv.

Reînsămânțare înseamnă numărul de repetări ale procedurii prin care celulele sunt împărțite după inițierea unei culturi din stoc congelat. Reînsămânțarea inițială care a pornit de la stocul congelat primește numărul unu (1). Celulele care au fost împărțite o dată sunt etichetate ca reînsămânțarea 2 etc.

PBS este soluția salină tamponată cu fosfat Dulbecco.

Controlul calității, abreviat CC, înseamnă măsurile necesare pentru a asigura date valide.

Placă de control al calității înseamnă o placă cu 24 de godeuri care include două concentrații de martori pozitivi și negativi pentru a monitoriza performanța unui nou lot de celule sau pentru a furniza martorii pozitivi pentru probă la testarea substanțelor chimice.

Test preliminar înseamnă un experiment independent, caracterizat printr-un nou set de soluții și martori.

▼**M5**

Mediu de stoc înseamnă baza pentru prepararea altor reactivi. Acesta constă într-un amestec 1:1 de mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) și amestec nutritiv F-12 Ham (DMEM/F12) în 15 mM tampon HEPES fără roșu fenol sau bicarbonat de sodiu. Bicarbonatul de sodiu este adăugat ca tampon, a se vedea anexa II la raportul de validare (4).

Mediu de completare înseamnă mediu de stoc plus BD Nu-Serum și amestec premium ITS+, a se vedea anexa II la raportul de validare (4).

Steroidogeneză înseamnă mecanismul de sinteză care conduce de la colesterol la diferiți hormoni steroizi. Mai mulți intermediari din mecanismul de sinteză a steroizilor, cum ar fi progesteron și testosteron, sunt hormoni importanți în sine, dar sunt, de asemenea, precursori pentru hormoni ulteriori în mecanismul de sinteză.

T reprezintă testosteronul, unul dintre cei doi androgeni mai importanți din sistemele mamiferelor.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

Placă de test înseamnă placa pe care celulele H295R sunt expuse la substanțe chimice de testat. Plăcile de testare cuprinde martorul pentru solvent și substanța chimică de testat la șapte niveluri de concentrație, în trei exemplare.

Tripsină 1X înseamnă o soluție diluată a enzimei tripsină, o serin-protează pancreatică, utilizată pentru a desprinde celulele de pe o placă de cultură de celule, a se vedea apendicele III la raportul de validare (4).

▼M5

B.58. TESTE DE MUTAȚIE GENETICĂ PRIVIND CELULELE GERMINALE ȘI SOMATICE LA ROZĂTOARE TRANSGENICE

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (OT) nr. 488 (2013). Metodele de testare UE sunt disponibile pentru o gamă largă de teste de mutație *in vitro* care sunt în măsură să detecteze mutații genetice și/sau cromozomiale. Există metode de testare pentru parametri *in vivo* (de exemplu, aberații cromozomiale și sinteza neprogramată a ADN-ului); totuși, acestea nu măsoară mutațiile genetice. Testele de mutație la rozătoare transgenice (RTG) răspund nevoii de teste *in vivo* practice și disponibile pe scară largă pentru mutații genetice.

2. Testele de mutație RTG au fost examinate pe larg (24) (33). Acestea utilizează șobolani și șoareci transgenici care prezintă mai multe copii de plasmidă integrată cromozomial sau vectori de navetă. Transgenele conțin gene reporter pentru detectarea diferitelor tipuri de mutații induse *in vivo* cu ajutorul substanțelor chimice de testat.

3. Mutațiile care apar la un rozător sunt marcate prin recuperarea transgenă și analizarea fenotipului genei reporter într-o gazdă bacteriană care nu prezintă gena reporter. Testele de mutație genică RTG măsoară mutațiile induse în gene neutre din punct de vedere genetic recuperate din aproape orice țesut al rozătoarelor. Prin urmare, astfel de teste ocolesc multe dintre limitările existente asociate cu studiul *in vivo* al mutației genetice în gene endogene (de exemplu, țesuturi limitate adecvate pentru analize, selecție negativă/pozitivă față de mutații).

4. Datele existente sugerează că transgenele răspund la mutageni într-un mod similar cu genele endogene, în special în ceea ce privește detectarea substituțiilor de perechi de baze, a mutațiilor de secvențe și a unor mici deleții și inserții (24).

5. Atelierele de lucru internaționale privind testarea genotoxicității (IWGT) au aprobat includerea testelor de mutație genică RTG pentru detectarea *in vivo* a mutațiilor genetice și au recomandat un protocol de punere în aplicare a acestora (15) (29). Prezenta metodă de testare se bazează pe recomandările respective. Analizele ulterioare în sprijinul utilizării prezentului protocol pot fi consultate la nota (16).

6. Se estimează că, în viitor, ar putea fi posibil să se combine un test de mutație genică RTG cu un studiu de toxicitate cu doze repetate (capitolul B.57 din prezenta anexă). Cu toate acestea, sunt necesare date pentru a se asigura că sensibilitatea testelor de mutație genică RTG nu este afectată de perioada mai scurtă cu o zi dintre sfârșitul perioadei de administrare și data eșantionării, astfel cum este utilizată în studiul de toxicologie cu doze repetate, față de perioada 3 de zile utilizată în testele de mutație genică RTG. De asemenea, sunt necesare date pentru a indica faptul că performanța testului cu doze repetate nu este afectată negativ de utilizarea unei sușe de rozătoare transgenice, mai degrabă decât sușele de rozătoare tradiționale. Atunci când astfel de date vor fi disponibile, metoda de testare va fi actualizată.

7. Definițiile principalilor termeni sunt prevăzute în apendice.

▼M5

CONSIDERAȚII INIȚIALE

8. Testele de mutație genică RTG pentru care sunt disponibile date suficiente pentru a sprijini utilizarea acestora în prezenta metodă de testare sunt: șoarecele bacteriofag *lacZ* (Muta™Mouse); șoarecele plasmidic *lacZ*; șoarecele și șobolanul *gpt* delta (*gpt* și Spi$^-$); șoarecele și șobolanul *lacI* (Big Blue®), astfel cum este efectuat în condiții standard. În plus, testul de selecție pozitivă *cII* se poate utiliza pentru evaluarea mutațiilor în modelele Big Blue® și Muta™Mouse. Mutageneza în modelele RTG este evaluată în mod normal ca frecvență a genelor mutante; cu toate acestea, dacă este necesar, analiza moleculară a mutațiilor poate furniza informații suplimentare (a se vedea punctul 24).

9. Testele de mutații genetice *in vivo* la rozătoare sunt deosebit de relevante pentru evaluarea riscului mutagen, întrucât răspunsurile testelor sunt dependente de metabolismul, farmacocinetica, procesele de reparare a ADN-ului și sinteza ADN-ului prin transleziune *in vivo*, deși acești parametri pot să varieze între specii, între țesuturi și între tipuri de daune asupra ADN-ului. Un test *in vivo* pentru mutații genetice este util pentru studierea ulterioară a unui efect mutagen detectat printr-un sistem *in vitro* și pentru urmărirea rezultatelor testelor utilizând alți parametri *in vivo* (24). Pe lângă faptul că este asociată cauzal cu inducerea cancerului, mutația genică este un parametru relevant pentru predicția bolilor necanceroase pe bază de mutații la nivelul țesuturilor somatice (12) (13), precum și a bolilor cu transmitere pe linia germinală.

10. Dacă există dovezi că substanța de testat, sau un metabolit relevant, nu va afecta niciunul dintre țesuturile de interes, nu este necesar să se efectueze un test de mutație genică RTG.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. În testele descrise la punctul 8, gena țintă este de origine bacteriană sau bacteriofagă, iar mijloacele de recuperare din ADN-ul genomic al rozătoarelor sunt prin încorporarea transgenei într-un bacteriofag λ sau un vector de transfer plasmidic. Procedura implică extracția de ADN genomic din țesutul de interes al rozătoarelor, prelucrarea *in vitro* a ADN-ului genomic (și anume, asamblarea de vectori λ sau ligarea și electroporarea plasmidelor pentru a recupera vectorul de transfer) și detectarea ulterioară a mutațiilor în gazde bacteriene în condiții adecvate. Testele utilizează transgene neutre, care sunt ușor de recuperat din cele mai multe țesuturi.

12. Experimentul de mutație genică RTG de bază implică tratarea rozătoarelor cu o substanță chimică pentru o perioadă de timp. Substanțele chimice pot fi administrate pe orice cale adecvată, inclusiv implantare (de exemplu, testarea unui dispozitiv medical). Perioada totală în care un animal este tratat este numită perioadă de administrare. Administrarea este urmată, de regulă, de o perioadă de timp înainte de sacrificare în care nu se administrează substanțe chimice și în timpul căreia leziunile ADN nereparate sunt fixate în mutații stabile. În literatura de specialitate, această perioadă a fost numită în diferite surse fie timp de manifestare, fie timp de fixare sau timp de exprimare; sfârșitul acestei perioade este momentul eșantionării (15) (29). După ce animalul este sacrificat, ADN-ul genomic este izolat din țesutul/țesuturile de interes și purificat.

▼M5

13. De regulă, se colectează date pentru un singur țesut pentru fiecare animal din asamblări/ligări multiple, iar frecvența mutantului se evaluează, în general, utilizând un total cuprins între 10^5 și 10^7 unități formatoare de plăci sau unități formatoare de colonii. Atunci când se utilizează metode de selecție pozitive, unitățile formatoare de plăci totale se determină cu un set separat de plăci neselective.

14. S-au dezvoltat metode de selecție pozitive pentru a facilita detectarea mutațiilor atât în gena *gpt* [șoarece și șobolan *gpt* delta, fenotip *gpt*$^-$ (20) (22) (28)], cât și în gena *lacZ* [Muta™Mouse sau șoarece plasmidic *lacZ* (3) (10) (11) (30)]; dimpotrivă, mutațiile genetice *lacI* la animale Big Blue® sunt detectate utilizând o metodă neselectivă care identifică genele mutante prin generarea de plăci colorate (albastre). Metodologia de selecție pozitivă se aplică, de asemenea, pentru a detecta mutații punctuale care apar în gena *cII* a vectorului de transfer bacteriofag λ [șoarece sau șobolan Big Blue® și Muta™Mouse (17)] și mutațiile de ștergere in genele λ *red* și *gam* [selecție Spi$^-$ la șoarece și șobolan *gpt* delta (21) (22) (28)]. Frecvența genelor mutante se calculează prin împărțirea numărului de plachete/plasmide care conțin mutații în transgenă la numărul total de plachete/plasmide recuperate din aceeași probă de ADN. În studiile de mutație genică RTG, frecvența genelor mutante este parametrul raportat. În plus, frecvența mutației se poate determina, de asemenea, ca fracțiunea celulelor care prezintă mutații independente; calculul necesită corecție pentru expansiunea clonală prin secvențierea genelor mutante recuperate (24).

15. Mutațiile marcate în testele de punct de mutație *lacI, lacZ, cII* și *gpt* constau, în principal, în mutații de substituție a perechilor de bază, mutații de secvențe și mici inserții/deleții. Proporția relativă a acestor tipuri de mutație în cadrul mutațiilor spontane este similară cu cea observată la gena Hptr endogenă. Deleții mari sunt detectate numai cu selecția Spi$^-$ și în testele de plasmide *lacZ* (24). Mutațiile de interes sunt mutații *in vivo* care apar la șoarece sau la șobolan. Mutațiile *in vitro* și *ex vivo* care pot apărea în timpul recuperării, al replicării sau al reparării fage/plasmidice sunt relativ rare, iar în unele sisteme acestea pot fi identificate în mod specific sau pot fi excluse de sistemul de selecție gazdă/pozitiv bacterian.

DESCRIEREA METODEI

Preparate

Selectarea speciilor de animale

16. În prezent sunt disponibile o varietate de modele de detectare a mutațiilor genetice la șoareci transgenici, iar astfel de sisteme au fost utilizate pe scară mai largă decât modelele care utilizează șobolani transgenici. În cazul în care șobolanul este în mod clar un model mai adecvat decât șoarecele (de exemplu, atunci când se studiază mecanismul carcinogenezei pentru o tumoră observată doar la șobolani, pentru corelarea cu un studiu de toxicitate pe șobolan sau dacă se știe că metabolismul șobolanului este mai reprezentativ pentru metabolismul uman), trebuie să se ia în considerare utilizarea modelelor cu șobolani transgenici.

Condiții de adăpost și de hrănire

17. În spațiul pentru adăpostirea animalelor de experiență se asigură o temperatură de 22 °C (± 3 °C). Deși umiditatea relativă trebuie să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția perioadelor de curățare a sălii, obiectivul ar fi menținerea unei umidități relative de 50-60 %. Iluminatul trebuie să fie artificial, cu o alternanță zilnică de 12 ore de lumină, urmate de 12 de ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de

▼M5

apă potabilă. Alegerea tipului de hrană poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al substanței de testat, atunci când aceasta se administrează pe această cale. Animalele se adăpostesc în grupuri mici (cel mult cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează un comportament agresiv. Animalele pot fi adăpostite individual, dacă acest lucru se justifică din punct de vedere științific.

Pregătirea animalelor

18. Animale adulte, mature sexual, tinere și sănătoase (cu vârsta de 8-12 săptămâni la începutul tratamentului) sunt repartizate aleatoriu în grupurile de control și de tratament. Animalele sunt identificate individual. Animalele sunt aclimatizate la condițiile de laborator timp de cel puțin cinci zile. Cuștile trebuie aranjate astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minimum. La începutul studiului, variația greutății animalelor ar trebui să fie minimă și să nu depășească ± 20 % din greutatea medie a fiecărui sex.

Prepararea dozelor

19. Substanțele chimice de testat în stare solidă trebuie dizolvate sau suspendate în solvenții sau vehicule corespunzătoare sau amestecate în hrană sau în apă înainte de a fi administrate animalelor. Substanțele chimice de testat în formă lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expunerile prin inhalare, substanțele chimice de testat pot fi administrate sub formă de gaz, vapori sau aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Se utilizează preparate proaspete de substanță de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al stocării.

Condiții de testare

Solvent/vehicul

20. Solventul/vehiculul nu ar trebui să producă efecte toxice la volumele de doză utilizate și nu ar trebui să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanța de testat. Dacă se utilizează alți solvenți/vehiculi decât cei recunoscuți, includerea acestora trebuie să fie justificată cu date de referință care să le demonstreze compatibilitatea. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi un solvent/vehicul apos.

Martorii pozitivi

21. În mod normal, trebuie să se utilizeze animale martori pozitivi concomitenți. Cu toate acestea, pentru laboratoarele care au demonstrat competență (a se vedea punctul 23) și care utilizează în mod obișnuit testele, ADN-ul de la animale tratate care au fost anterior martori pozitivi poate fi inclus în fiecare studiu pentru a confirma succesul metodei. ADN-ul de la experimentele anterioare trebuie să fie obținut de la aceleași specii și țesuturi de interes și să fie depozitat adecvat (a se vedea punctul 36). Atunci când se utilizează martori pozitivi concomitenți, nu este necesară administrarea pe aceeași cale ca și substanța de testat; cu toate acestea, controalele pozitive trebuie să fie cunoscute ca inducând mutații în unul sau mai multe țesuturi de interes pentru substanța de testat. Dozele de substanțe chimice martori pozitivi trebuie selectate astfel încât să producă efecte slabe sau moderate, care evaluează critic performanța și sensibilitatea testului. Exemple de substanțe chimice martori pozitivi și unele dintre țesuturile țintă pentru acestea sunt incluse în tabelul 1.

▼M5

Tabelul 1

Exemple de substanțele martor pozitive și unele țesuturi țintă

Substanța chimică utilizată ca martor pozitiv și nr. CAS	Denumire Einecs și nr. Einecs	Caracteristici	Mutație țesut țintă	
			Șobolan	Șoarece
N-etil-N-nitrozouree [CAS nr. 759-73-9]	N-etil-N-nitrozouree [212-072-2]	Mutagen cu acțiune directă	Ficat, plămân	Măduva osoasă, colon, epiteliul colonului, intestin, plămân, ficat, splină, rinichi, celule granuloase ovariene, celule germinale masculine
Carbamat de etil (uretan) [CAS nr. 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, necesită metabolism, dar produce doar efecte slabe		Măduva osoasă, prestomac, intestin subțire, plămân, ficat, splină
2,4-Diaminotoluen [CAS nr. 95-80-7]	4-metil-m-fenilen-diamină [202-453-1]	Mutagen, necesită metabolism, de asemenea pozitiv în testul Spi⁻	Ficat	Ficat
Benzo[a]piren [CAS nr. 50-32-8]	Benzo[def]crizen [200-028-5]	Mutagen, necesită metabolism	Ficat, omenta,	Măduva osoasă, sân, colon, prestomac, stomac glandular, inimă, ficat, plămân, celule germinale masculine

Martorii negativi

22. Martorii negativi, tratați doar cu solvent sau vehicul, dar altfel tratați în același mod precum grupurile tratate, trebuie să fie incluși la fiecare prelevare de probe. În absența unor date anterioare sau publicate referitoare la martori care să ateste că solventul/vehiculul selectat nu prezintă efecte vătămătoare sau mutagene, martori netratați trebuie să fie, de asemenea, incluși pentru fiecare prelevare de probe, pentru a stabili acceptabilitatea martorilor pentru vehicul.

Verificarea competenței laboratorului

23. Competența în astfel de teste se stabilește prin demonstrarea capacității de a reproduce rezultatele preconizate din datele publicate (24) pentru: 1. frecvențele genelor mutante cu substanțe chimice utilizate ca martori pozitivi (inclusiv răspunsuri slabe), cum ar fi cele enumerate în tabelul 1, nonmutageni și martori pentru vehicul; și 2. recuperarea transgenică din ADN genomic (de exemplu, eficiența de asamblare).

Secvențierea genelor mutante

24. Pentru aplicații de reglementare, nu este necesară secvențierea ADN a genelor mutante, în special în cazul în care se obține un rezultat pozitiv sau negativ clar. Cu toate acestea, datele de secvențiere pot fi utile atunci când se observă o variabilitate ridicată între indivizi. În aceste cazuri, secvențierea poate fi utilizată pentru a exclude posibilitatea de jackpot-uri sau evenimente clonale prin identificarea proporției de gene mutante unice dintr-un anumit țesut. Secvențierea a aproximativ 10 gene mutante pe țesut

▼M5

pentru fiecare animal ar trebui să fie suficientă pentru a determina pur și simplu dacă genele mutante clonale contribuie la frecvența genelor mutante; pentru corectarea matematică a frecvenței mutante pentru clonalitate, ar putea fi necesară secvențierea a nu mai puțin de 25 de gene mutante. De asemenea, se poate lua în considerare secvențierea genelor mutante atunci când se constată creșteri mici ale frecvenței mutante (de exemplu, aceasta depășește cu puțin valorile martorilor netratate). Diferențele în spectrul mutant între coloniile mutante de la animalele tratate și netratate pot sprijini constatarea unui efect mutagen (29). De asemenea, spectrele de mutație pot fi utile pentru dezvoltarea de ipoteze mecaniciste. În cazul în care secvențierea trebuie să fie inclusă ca parte a protocolului de studiu, trebuie să se acorde o atenție deosebită conceperii unor astfel de studii, în special în ceea ce privește numărul de gene mutante secvențiate pe eșantion, pentru a obține puterea adecvată în funcție de modelul statistic (a se vedea punctul 43).

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

25. Numărul de animale pe grup trebuie predeterminat astfel încât să fie suficient pentru a furniza puterea statistică necesară pentru a detecta cel puțin o dublare a frecvenței mutante. Grupurile vor fi alcătuite din cel puțin cinci animale; cu toate acestea, dacă puterea statistică este insuficientă, ar trebui să se crească numărul de animale în funcție de necesități. În mod normal se utilizează masculi. Pot exista cazuri în care ar fi justificată testarea doar pe femele, de exemplu, atunci când se testează medicamente de uz uman pentru femei sau când se studiază metabolismul specific feminin. În cazul în care există diferențe semnificative între sexe în ceea ce privește toxicitatea sau metabolismul, vor fi necesari atât masculi, cât și femele.

Perioadă de administrare

26. Pe baza observațiilor conform cărora mutațiile se acumulează cu fiecare tratament, este necesar un regim de doze repetate, cu tratamente zilnice, pentru o perioadă de 28 de zile. Aceasta perioadă este considerată, în general, acceptabilă atât pentru producerea unei acumulări suficiente de mutații produse de mutageni slabi, cât și pentru a acorda un timp adecvat de expunere pentru detectarea mutațiilor în organele care proliferează lent. Pentru anumite evaluări, pot fi adecvate regimuri alternative de tratament, iar schemele alternative de administrare trebuie să fie justificate în mod științific în protocol. Tratamentele nu trebuie să fie mai scurte decât timpul necesar pentru inducerea completă a tuturor enzimelor metabolizatoare relevante, iar tratamentele mai scurte pot necesita utilizarea mai multor momente de prelevare a probelor, care sunt potrivite pentru organe cu diferite rate de proliferare. În orice caz, trebuie să se utilizeze toate informațiile disponibile (de exemplu, cu privire la toxicitatea generală sau metabolism și farmacocinetică) atunci când se justifică un protocol, în special atunci când există abateri de la recomandările standard de mai sus. Deși ar putea ameliora sensibilitatea, durata de tratament mai lungă de opt săptămâni trebuie să fie explicată în mod clar și justificată, întrucât duratele lungi de tratament pot produce o creștere evidentă în frecvență a genelor mutante prin expansiune clonală (29).

Doze

27. Nivelurile dozelor trebuie să se bazeze pe rezultatele unui studiu de stabilire a nivelurilor de doză care măsoară toxicitatea generală, realizat utilizând aceeași cale de expunere, sau pe baza rezultatelor studiilor anterioare de toxicitate sub-acută. Pentru determinarea nivelurilor de doză, se pot utiliza animale non-transgenice din aceeași sușă de rozătoare. În testul principal, pentru a obține informații de răspuns la doză, un studiu complet trebuie să includă un grup martor negativ (a se vedea punctul 22) și cel puțin trei niveluri de dozare distanțate corespunzător, cu excepția cazului în care s-a

▼M5

utilizat doza limită (a se vedea punctul 28). Doza maximă trebuie să fie doza maximă tolerată (DMT). DMT este definită ca doza care produce semne de toxicitate astfel încât se preconizează că doze mai mari, administrate în același regim de dozare, ar fi letale. Substanțele chimice cu activitate biologică specifică la doze netoxice mici (cum ar fi hormonii și mitogenii) și substanțele chimice care prezintă saturare de proprietăți toxicocinetice pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și trebuie să fie evaluate de la caz la caz. Dozele utilizate trebuie să acopere un interval de la toxicitate maximă la toxicitate mică sau absența oricărei toxicități.

Test limită

28. În cazul în care experimentele de stabilire a nivelurilor de doză sau datele existente de la speciile de rozătoare conexe indică faptul că un regim de tratament cu cel puțin doza limită (a se vedea mai jos) nu produce efecte toxice detectabile și dacă nu s-ar preconiza genotoxicitate pe baza datelor de la substanțe chimice înrudite structural, atunci un studiu complet cu utilizarea a trei doze de mărimi diferite ar putea să nu fie considerat necesar. Pentru o perioadă de administrare de 28 de zile (de exemplu, 28 de tratamente zilnice), doza limită este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. Pentru perioade de administrare de 14 zile sau mai puțin, doza limită este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi (regimurile de dozare care diferă de 28 de tratamente zilnice trebuie să fie justificate în mod științific în protocol, a se vedea punctul 26).

Administrarea dozelor

29. Substanța de testat se administrează, de regulă, prin gavaj cu ajutorul unui tub stomacal sau al unei canule de intubație adecvate. În general, la conceperea unui test trebuie să se ia în considerare calea anticipată de expunere a omului. Prin urmare, se pot accepta alte căi de expunere (cum ar fi în apa potabilă, subcutanat, intravenos, local, prin inhalare, intratraheal, în hrană sau implantare), în cazul în care acestea pot fi justificate. Injectarea intraperitoneală nu este recomandată deoarece aceasta nu este o cale fiziologică relevantă de expunere a omului. Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 2 ml/100g greutate corporală. Utilizarea unor volume mai mari decât acesta trebuie să fie justificată. Cu excepția substanțelor chimice iritante și corozive, care vor prezenta în mod normal efecte exacerbate la concentrații mai mari, variația volumului testat trebuie să fie redusă la minimum prin ajustarea concentrației, pentru a asigura un volum constant pentru toate dozele.

Timpul de eșantionare

Celulele somatice

30. Timpul de eșantionare este o variabilă esențială deoarece este determinată de perioada necesară pentru fixarea mutațiilor. Această perioadă este specifică țesutului și pare să fie legată de timpul de reînnoire al populației de celule, măduva osoasă și intestinul având răspuns rapid, iar ficatul fiind mult mai lent. Un compromis adecvat pentru măsurarea frecvențelor mutante în țesuturile cu proliferare rapidă și lentă este de 28 de tratamente zilnice consecutive (astfel cum este indicat la punctul 26) și prelevarea de probe la trei zile după tratamentul final, deși, în aceste condiții, frecvența maximă a genelor mutante ar putea să nu se manifeste în țesuturile cu proliferare lentă. În cazul în care țesuturile cu proliferare lentă sunt deosebit de importante, atunci ar putea fi mai adecvată o prelevare ulterioară la 28 de zile după perioada de administrare de 28 zile (16) (29). În astfel de cazuri, prelevarea ulterioară va înlocui prelevarea la 3 zile și ar necesita o justificare științifică.

▼M5

Celulele germinale

31. Testele RTG sunt adecvate studiului de inducție de mutații genetice pe celule germinale masculine (7) (8) (27), în care calendarul și cinetica spermatogenezei au fost bine definite (27). Numerele scăzut de ovule disponibile pentru analiză, inclusiv după super-ovulație și faptul că nu există o sinteză ADN în ovocit împiedică determinarea mutației în celulele germinale feminine utilizând teste transgenice (31).

32. Timpii de prelevare a probelor de celule germinale masculine ar trebui să fie selectați astfel încât să se eșantioneze gama de tipuri de celule expuse de-a lungul dezvoltării celulelor germinale, iar etapa vizată în prelevarea de probe să fi primit expunere suficientă. Timpul necesar pentru progresia celulelor germinale în dezvoltare de la celule stem spermatogoniale la spermă matură care ajunge în vasele deferente/epididimul caudal este de ~ 49 de zile pentru șoarece (36) și ~ 70 zile de la șobolan (34) (35). După o expunere de 28 de zile, cu o perioadă ulterioară de eșantionare de trei zile, sperma acumulată colectată din vasele deferente/epididimul caudal (7) (8) va reprezenta o populație de celule expuse pe parcursul a aproximativ celei de-a doua jumătăți a spermatogenezei, care include perioada meiotică și perioada postmeiotică, dar nu și perioada spermatogonială sau a celulei stem. Pentru a preleva în mod adecvat celule din vasele deferente/epididimul caudal care erau celule stem spermatogoniale în timpul perioadei de expunere, este necesar un timp de eșantionare suplimentar de cel puțin 7 săptămâni (șoareci) sau 10 săptămâni (șobolan) după terminarea tratamentului.

33. Celulele extrudate din tubii seminiferi după un regim de 28 + 3 zile cuprind o populație mixtă îmbogățită pentru toate etapele de dezvoltare a celulelor germinale (7) (8). Prelevarea celulelor respective pentru detectarea mutațiilor genetice nu oferă o evaluare la fel de precisă a etapelor în care sunt induse mutațiile celulelor germinale în comparație cu cele care pot fi obținute de la prelevarea de probe de spermatozoizi din vasele deferente/epididimul caudal (deoarece există o serie de tipuri de celule germinale prelevate de la nivelul tubilor și vor exista unele celule somatice care contaminează populația de celule). Cu toate acestea, prelevarea de probe de celule din tubii seminiferi pe lângă spermatozoizii din vasele deferente/epididimul caudal în urma doar a unui regim de eșantionare de 28 + 3 zile ar asigura o oarecare acoperire a celulelor expuse pe parcursul majorității fazelor de dezvoltare a celulelor germinale și poate fi utilă pentru detectarea unor mutageni ai celulelor embrionare.

Observații

34. Se recomandă ca observațiile clinice generale să fie efectuate cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Starea de sănătate a animalelor trebuie consemnată. Cel puțin de două ori pe zi, toate animalele sunt examinate pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Toate animalele trebuie cântărite cel puțin o dată pe săptămână și la sacrificare. Măsurarea consumului de hrană se face cel puțin săptămânal. În cazul în care substanța de testat se administrează în apa de băut, consumul de apă trebuie măsurat la fiecare schimbare a apei și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă trebuie să fie eutanasiate înainte de finalizarea perioadei de testare (23).

▼M5

Colectarea de țesuturi

35. Justificarea pentru colectarea de țesuturi trebuie să fie clar definită. Întrucât este posibil să se studieze inducția mutației în aproape orice țesut, selecția țesuturilor colectate trebuie să se bazeze pe motivul pentru efectuarea studiului și pe orice date existente privind mutagenitatea, carcinogenitatea sau toxicitatea pentru substanța chimică care face obiectul studiului. Factorii importanți de luat în considerare trebuie să includă calea de administrare (pe baza căii/căilor de expunere probabilă/probabile la om), distribuția preconizată în țesuturi și eventuale mecanisme de acțiune. În absența oricăror informații de context, ar trebui să se colecteze mai multe țesuturi somatice, după cum pot fi de interes. Acestea ar trebui să reprezinte țesuturi cu proliferare rapidă, țesuturi cu proliferare lentă și țesuturi de la locul de contact. În plus, spermatozoizii din vasele deferente/epididimul caudal și celulele germinale în curs de dezvoltarea din tubii seminiferi (conform descrierii de la punctele 32 și 33) ar trebui să fie colectați și stocați în cazul în care ar putea fi necesară o viitoare analiză privind mutagenitatea celulelor germinale. Trebuie să se consemneze greutatea organelor, iar pentru organele mari, trebuie să se realizeze prelevări din aceeași zonă de la toate animalele.

Stocarea țesuturilor și a AND-ului

36. Țesuturile (sau omogenatele tisulare) trebuie să fie păstrate la temperaturi sub – 70 °C și să fie utilizate pentru izolarea ADN-ului în termen de 5 ani. ADN-ul izolat, păstrat în frigider la 4 °C în tampon adecvat, ar trebui să fie utilizat în mod optim pentru analiza mutației în termen de 1 an.

Selecția țesuturilor pentru analiza genelor mutante

37. Alegerea țesuturilor trebuie să se bazeze pe considerente precum: 1. calea de administrare sau locul primului contact (de exemplu, stomacul glandular, în cazul administrării orale, plămânul în cazul administrării prin inhalare sau pielea în cazul aplicării topice); și 2. parametrii farmacocinetici observați în studiile de toxicitate generală, care indică dispunerea, reținerea sau acumularea țesutului sau organele țintă pentru toxicitate. În cazul în care studiile sunt realizate pentru a urmări studiile de carcinogenitate, trebuie să se ia în considerare țesuturile țintă pentru carcinogenitatea. Alegerea țesuturilor pentru analiză ar trebui să maximizeze detectarea substanțelor chimice care sunt mutageni cu acțiune directă *in vitro*, metabolizați rapid, foarte reactivi sau slab absorbiți sau pentru care țesutul țintă este determinat de calea de administrare (6).

38. În absența unor informații de bază și luând în considerare locul de contact datorat căii de administrare, ficatul și cel puțin un țesut cu divizare rapidă (de exemplu, stomacul glandular, măduva osoasă), trebuie să fie evaluate pentru mutagenitate. În cele mai multe cazuri, cerințele de mai sus pot fi îndeplinite prin analizarea a două țesuturi atent selectate, dar în unele cazuri ar putea fi necesare trei sau mai multe țesuturi. În cazul în care există motive de preocupare specifică privind efectele asupra celulelor germinale, inclusiv răspunsuri pozitive în celulele somatice, trebuie să se evalueze țesuturile celulelor germinale pentru determinarea mutațiilor.

Metode de măsurare

39. Metodele standard de laborator sau metodele publicate pentru detectarea genelor mutante sunt disponibile pentru modelele transgenice recomandate: bacteriofag și plasmidă lambda *lacZ* (30); șoarece *lacI* (2) (18); șoarece delta *gpt* (22); șobolan delta *gpt* (28); *cII* (17). Modificările trebuie să fie justificate și documentate în mod corespunzător. Date din mai multe asamblări pot fi agregate și utilizate pentru a ajunge la un număr adecvat de plăci sau colonii. Cu toate acestea, necesitatea unui număr mare de reacții de asamblare pentru a ajunge la numărul adecvat de plachete poate fi un indiciu de ADN de proastă calitate. În astfel de cazuri, datele trebuie să fie luate în considerare cu atenție deoarece acestea ar putea să nu fie fiabile. Numărul total optim de plachete sau colonii per probă de ADN este

▼M5

guvernat de probabilitatea statistică de detectare a unui număr suficient de gene mutante, la o anumită frecvență spontană a genelor mutante. În general, sunt necesare cel puțin 125 000 — 300 000 de plachete dacă frecvența spontană a genelor mutante este de ordinul a 3×10^{-5} (15). Pentru testul Big Blue® *lacI*, este important să se demonstreze că întreaga serie de fenotipuri mutante de culoare poate fi detectată prin includerea unor martori corespunzători de culoare în același timp cu fiecare alcătuire de plăci. Țesuturile și probele rezultate (elemente) trebuie prelucrate și analizate utilizând un concept bloc, în care elemente de la grupul martor pentru vehicul/solvent, grupul martor pozitiv (dacă este utilizat) sau ADN martor pozitiv (dacă este cazul) și fiecare grup de tratament sunt prelucrate împreună.

DATE ȘI RAPORT

Prelucrarea rezultatelor

40. Datele pentru fiecare animal trebuie să fie prezentate sub formă de tabel. Unitatea experimentală este animalul. Raportul trebuie să includă numărul total de unități formatoare de plăci (ufp) sau unități formatoare de colonii (ufc), numărul de gene mutante și frecvența genelor mutante pentru fiecare țesut de la fiecare animal. În cazul în care există mai multe reacții de asamblare/salvare, trebuie să se raporteze numărul de reacții per probă de ADN. Deși trebuie să se păstreze datele pentru fiecare reacție în parte, trebuie să se raporteze doar valorile totale ale ufp sau ufc. Trebuie să se raporteze datele cu privire la toxicitate și semne clinice în conformitate cu punctul 34. Orice rezultate de secvențiere trebuie să fie prezentate pentru fiecare mutant analizat și trebuie să se arate calculele de frecvență a mutației care rezultă pentru fiecare animal și țesut.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor statistice

41. Există o serie de criterii pentru determinarea unui rezultat pozitiv, cum ar fi o creștere dependentă de doză a frecvenței mutante sau o creștere clară a frecvenței mutante într-un singur grup de doză în comparație cu grupul martor pentru solvent/vehicul. Pentru a furniza date suficiente pentru analiza doză-răspuns, se analizează cel puțin trei grupuri de doze tratate. În timp ce relevanța biologică a rezultatelor trebuie să fie considerată primordială, se pot utiliza metode statistice adecvate ca instrument în evaluarea rezultatelor testelor (4) (14) (15) (25) (26). Testele statistice utilizate trebuie să ia în considerare animalul ca unitate experimentală.

42. O substanță chimică de testat pentru care rezultatele nu îndeplinesc criteriile de mai sus, în orice tip de țesut, este considerată nemutagenă în cadrul testului. Pentru relevanța biologică a unui rezultat negativ, trebuie confirmată expunerea țesutului.

43. Pentru analizele de secvențiere a ADN-ului, sunt disponibile o serie de abordări statistice pentru a contribui la interpretarea rezultatelor (1) (5) (9) (19).

44. Analizarea faptului dacă valorile observate se situează în interiorul sau în afara intervalului martor istoric poate oferi orientare în evaluarea semnificației biologice a răspunsului (32).

▼M5

Raportul de testare

45. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— date de identificare și nr. CAS, dacă se cunosc;

— sursa, numărul lotului, dacă sunt disponibile;

— natura fizică și puritatea;

— proprietățile fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului;

— stabilitatea substanței de testat, dacă se cunoaște.

Solvent/vehicul:

— justificarea alegerii vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;

— prepararea formulărilor hranei, a apei potabile sau inhalărilor;

— determinările analitice asupra formulărilor (de exemplu, stabilitatea, omogenitatea, concentrațiile nominale).

Animale de laborator:

— specia/sușa utilizată și o justificare pentru alegerea acestora;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, hrana etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului, inclusiv intervalul de greutate, greutatea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— datele privind martorii pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

— datele din studiul de stabilire a intervalului dozelor;

— justificarea alegerii dozelor utilizate;

— detalii privind prepararea substanței de testat;

— detalii privind administrarea substanței de testat;

— justificarea căii de administrare alese;

— metodele de măsurare a toxicității pentru animale, inclusiv, după caz, analize histopatologice sau hematologice și frecvența cu care s-au efectuat observațiile și cu care s-a măsurat greutatea corporală a animalelor;

— metodele de verificare pentru a constata dacă substanța de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

▼M5

— doză efectivă (mg/kg greutate corporală/zi), calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei;

— descrierea detaliată a regimului de dozare și a metodelor de eșantionare și justificările pentru alegerile făcute;

— metoda de eutanasiere;

— metodele de izolare și conservare a țesuturilor;

— metodele de izolare a ADN-ului genomic la rozătoare, salvarea transgenei din ADN-ul genomic și transferul ADN-ului transgenic la o gazdă bacteriană;

— sursa și numărul lotului pentru toate celulele, trusele și reactivii (după caz);

— metodele de numărare de mutanți;

— metodele de analiză moleculară a mutanților și utilizarea acestora în corectarea clonalității și/sau calcularea frecvențelor mutațiilor, dacă este cazul.

Rezultate:

— starea animalelor înaintea și pe întreaga durată a testului, inclusiv simptomele de toxicitate;

— valorile greutății corporale și a organelor la sacrificare;

— pentru fiecare țesut/animal, numărul genelor mutante, numărul de plăci sau colonii evaluate, frecvența genelor mutante;

— pentru fiecare țesut/grup de animale, numărul de reacții de asamblare pe probă de ADN, numărul total de gene mutante, frecvența medie a genelor mutante, deviația standard;

— relația doză-răspuns, dacă este posibil;

— pentru fiecare țesut/animal, numărul de gene mutante independente și frecvența medie a mutațiilor, în cazul în care a fost efectuată analiza moleculară a mutațiilor;

— date concomitente și date istorice privind martorii negativi cu intervale, valori medii și deviații standard;

— date concomitente privind martorii pozitivi (sau date neconcomintente privind martorii pozitivi ADN);

— determinări analitice, în cazul în care sunt disponibile (de exemplu, concentrațiile de ADN utilizate în asamblare, date privind secvențierea ADN-ului);

— analizele statistice și metodele aplicate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

▼**M5**

BIBLIOGRAFIE

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra, *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement, *Mutation Res.*, 518: 107-112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations *Nature*, 377(6550): 657-659.

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice*, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency, *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405-413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens, *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells, *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), Bayesian Analysis of Mutational Spectra, *Genetics*, 156: 1411-1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971-7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host, *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer, *Mutation Res.*, 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update, *Mutation Res*., 705: 96-106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta^{TM}Mouse Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), In vivo Transgenic Mutation Assays, *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing, Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212-218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis, Carcinogenesis, 29(4): 772778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections, Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465-470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice, *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9-15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays, *Mutation Res.*, 455(1–2): 191-215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay, Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231-245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study, Mutation. Res., 388(2–3): 249-289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays, Mutation. Res., 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers, Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), *In vivo* Transgenic Mutation Assays, *Mutation Res*., 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells, *Mutation Res*., 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MO-NO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52: 198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), The Epididymis, in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse, Genetica, 122: 25-36.

▼**M5**

Apendice

DEFINIȚII

Perioadă de administrare: perioada totală în care un animal este tratat.

Substituție pereche de bază: un tip de mutație care cauzează înlocuirea unei singure baze de nucleotide a ADN-ului cu o altă bază de nucleotide a ADN-ului.

Capsidă: învelișul proteic care înconjoară o particulă de virus.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec de substanțe.

Expansiune clonală: producerea de mai multe celule dintr-o singură celulă (mutant).

Unitate formatoare de colonii (ufc): o măsură a numărului de bacterii viabile.

Concatamer: o biomoleculă continuă lungă compusă din mai multe copii identice legate în serie.

Sit cos: un segment de 12 nucleotide de ADN monocatenar care există la ambele capete ale genomului dublu catenar bacteriofag lambda.

Deleție: o mutație în care genomul pierde una sau mai multe nucleotide (secvențiale).

Electroporare: aplicarea de impulsuri electrice pentru a crește permeabilitatea membranelor celulare.

Genă endogenă: o genă nativă genomului.

Variație extrabinomială: variabilitate mai mare în estimări repetate a unei părți a populației decât ar fi de așteptat în cazul în care populația ar avea o distribuție binomială.

Mutație care conduce la decalarea cadrului (frameshift): o mutație genetică cauzată de inserții sau deleții ale unui număr de nucleotide care nu este divizibil cu trei dintr-o secvență de ADN care codifică o proteină/peptidă.

Inserție: adăugarea uneia sau a mai multor perechi de baze de nucleotide într-o secvență de ADN.

Jackpot: un număr mare de gene mutante care au apărut prin expansiunea clonală dintr-o singură mutație.

Deleții mari: deleții în ADN-ul a mai mult de câteva kilobaze (care sunt detectate în mod eficient cu selecție Spi^- și testele de plasmide lacZ).

Ligare: legarea covalentă a două capete ale moleculelor de ADN utilizând ligaza ADN.

Mitogen: o substanță chimică care stimulează o celulă să înceapă diviziunea celulară, declanșând mitoza (și anume, diviziunea celulară).

Genă neutră: o genă care nu este afectată de presiuni selective pozitive sau negative.

Asamblare: sinteza de particule infecțioase ale unui fag de la un preparat de capsidă a unui fag și proteine de coadă și o concatamer de molecule ADN ale unui fag. Frecvent utilizată pentru a asambla ADN clonat pe un vector lambda (separat de sit-uri cos) în particule lambda infecțioase.

Eficiență de asamblare: eficiența cu care bacteriofagii asamblați sunt recuperați în bacterii gazdă.

▼M5

Unitate formatoare de plăci (ufp): o măsură a numărului de bacteriofagi viabili.

Mutație punctuală: un termen general pentru o mutație care afectează doar o mică secvență de ADN incluzând mici inserții, deleții și substituții de perechi de baze.

Selecție pozitivă: o metodă care permite numai genelor mutante să supraviețuiască.

Genă reporter: o genă al cărei produs de genă mutantă este ușor de detectat.

Timp de eșantionare: sfârșitul perioadei de timp, înainte de sacrificare, în care nu se administrează substanța chimică și în care leziunile ADN neprelucrate sunt fixate în mutații stabile.

Vector de transfer: un vector construit astfel încât să se poată propaga în două specii gazdă diferite; în consecință, ADN-ul inserat într-un vector de transfer poate fi testat sau manipulat în două tipuri diferite de celule sau două organisme diferite.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec de substanțe testat utilizând prezenta metodă de testare.

Transgenic: aparținând de, referitor la sau fiind un organism al cărui genom a fost modificat prin transferul unei gene sau al unor gene de la o altă specie.

▼M7

B.59. SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN CHEMICO*: TESTUL REACTIVITĂȚII DIRECTE A PEPTIDELOR (DPRA)

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 442 (2015). O substanță sensibilizantă pentru piele înseamnă o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definit în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). Această metodă de testare furnizează o procedură *in chemico* (Testul reactivității directe a peptidelor – DPRA) care urmează să fie utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP.

Există un acord general cu privire la principalele evenimentele biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente cu privire la mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2), de la evenimentul declanșator molecular, prin evenimentele intermediare până la efectele adverse, și anume dermatita alergică de contact la oameni sau hipersensibilitate de contact la rozătoare. În cadrul AOP a sensibilizării cutanate, evenimentul declanșator molecular este reprezentat de legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile din proteinele din piele.

Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, în general, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice bazate pe cobai, testul de maximizare Magnusson și Kligman (GMPT), testul Buehler [(MT B.6 (3)] studiază atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Un test pe murini, testul local asupra ganglionilor limfatici [LLNA, MT B.42 (4)] și cele două variante ale sale non-radioactive, LLNA: Da [MT B.50 (5)] și LLNA: BrdU-ELISA [MT B.51 (6)], care toate evaluează în mod exclusiv reacția de inducție, au beneficiat, de asemenea, de acceptare, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punct de vedere al bunăstării animalelor și o măsurare obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

Mai recent, metode de testare pe bază mecanică *in chemico* și *in vitro* au fost considerate valabile din punct de vedere științific pentru evaluarea pericolelor de sensibilizare cutanată ale substanțelor chimice. Cu toate acestea, vor fi necesare combinații de metode care nu se bazează pe animale (*in silico, in vitro, in chemico*) în cadrul strategiilor integrate de testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment – IATA) pentru a putea înlocui complet testele pe animale utilizate în prezent, având în vedere gradul restrâns de acoperire automată al AOP al fiecărei metode de testare care nu implică animale disponibilă în prezent (2) (7).

DPRA este propus pentru a aborda evenimentul declanșator molecular al AOP al sensibilizării cutanate, și anume reactivitatea proteinelor, prin cuantificarea reactivității substanțelor chimice testate față de peptidele model sintetice care conțin fie lizină, fie cisteină (8). Valorile depleției procentului de peptidă cisteină și lizină sunt utilizate ulterior pentru a clasifica o substanță în una dintre cele patru categorii de reactivitate pentru sprijinirea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante (9).

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

▼M7

DPRA a fost evaluat într-un studiu principal de validare efectuat într-un laborator de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testare pe animale (EURL ECVAM) și o revizuire independentă inter pares de către Comitetul științific consultativ (ESAC) din cadrul EURL ECVAM și a fost considerat valabil din punct de vedere științific (10) pentru a fi utilizat ca parte a unei IATA pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante, în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor DPRA în combinație cu alte informații sunt raportate în referințe bibliografice (11) (12) (13) (14).

Definițiile sunt prevăzute în apendicele I.

CONSIDERAȚII INIȚIALE, APLICABILITATE ȘI LIMITĂRI

Corelația reactivității proteinelor cu potențialul de sensibilizare cutanată este bine stabilită (15) (16) (17). Cu toate acestea, întrucât legarea proteinelor reprezintă doar un eveniment cheie, evenimentul declanșator molecular al AOP a sensibilizării cutanate, informațiile cu privire la reactivitatea proteinelor obținute cu metode de testare și metode care nu fac recurs la testări ar putea să nu fie suficiente în sine pentru a concluziona cu privire la absența potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele obținute prin această metodă de testare se iau în considerare în contextul unor abordări integrate precum IATA, acestea fiind combinate cu alte informații suplimentare, de exemplu obținute din testele *in vitro* care abordează alte evenimente importante ale AOP a sensibilizării cutanate, precum și prin metode care nu fac recurs la testări inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoage.

Această metodă de testare poate fi utilizată, în combinație cu alte informații suplimentare, pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și cele nesensibilizante în contextul IATA. Această metodă de testare nu poate fi utilizată în mod independent, nici pentru a subcategoriza substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite prin GHS al ONU/Regulamentul CLP, nici pentru a se prevedea potența pentru deciziile în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, un rezultat pozitiv obținut prin intermediul DPRA poate fi utilizat în mod independent pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

Metoda de testare a DPRA s-a dovedit a fi transferabilă către laboratoare cu experiență în analiza prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC). Nivelul de reproductibilitate al estimărilor care pot fi preconizate în urma metodei de testare este de ordinul a 85 % în cadrul laboratoarelor și 80 % între laboratoare (10). Rezultatele obținute în cadrul studiului de validare (18) și în studiile publicate (19) indică faptul că, în ansamblu, precizia DPRA la diferențierea substanțelor sensibilizante (și anume, cat. 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de cele nesensibilizante este de 80 % (N = 157) cu o sensibilitate de 80 % (88/109) și specificitate de 77 % (37/48) în raport cu rezultatele LLNA. DPRA are mai multe șanse să subestimeze substanțele chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de substanțele chimice care prezintă un grad ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (18) (19). Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru DPRA ca metodă de testare de sine stătătoare sunt doar orientative, întrucât metoda de testare se ia în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 9 de mai sus. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, se ia în vedere faptul că testul LLNA, precum și alte teste pe animale pot să nu reflecte pe deplin situația speciei de interes, și anume oamenii. Pe baza informațiilor generale disponibile, DPRA s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost determinat în studii *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice ale substanței chimice (8) (9) (10) (19). Coroborate, aceste informații indică utilitatea DPRA la contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată.

▼M7

Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în această metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea DPRA la testarea substanțelor și/sau a amestecurilor. Această metodă de testare nu se aplică testării compușilor metalici, întrucât aceștia sunt cunoscuți că reacționează cu proteinele cu alte mecanisme decât legătura covalentă. O substanță chimică de testat este solubilă în apă într-un solvent adecvat cu o concentrație finală de 100 mM (a se vedea punctul 18). Cu toate acestea, substanțele chimice de testat care nu sunt solubile la această concentrație pot fi testate în continuare la concentrații solubile mai mici. Într-un astfel de caz, un rezultat pozitiv ar putea fi utilizat în continuare pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca sensibilizant al pielii, dar nu se poate ajunge la nicio concluzie definitivă privind lipsa de reactivitate dintr-un rezultat negativ. În prezent, sunt disponibile puține informații cu privire la aplicabilitatea DPRA la amestecuri cu compoziție cunoscută (18) (19). Cu toate acestea, DPRA este considerat a fi aplicabil din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente cu compoziție cunoscută (a se vedea punctul 18). Înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate furniza rezultate adecvate pentru scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. Actualul model predictiv nu pot fi utilizat pentru amestecuri complexe cu compoziție necunoscută sau pentru substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice (și anume, substanțe UVCB) din cauza raportului molar definit de substanță chimică de testat și peptidă. În acest scop, este necesară dezvoltarea unui nou model predictiv, bazat pe o abordare gravimetrică. În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind neaplicabilitatea metodei de testare la alte categorii specifice de substanțe chimice, metoda de testare nu trebuie să fie utilizată la respectivele categorii specifice de substanțe chimice.

Această metodă de testare este o metodă *in chemico* care nu cuprinde un sistem metabolic. Substanțele chimice care necesită bioactivare enzimatică pentru a-și exercita potențialul de sensibilizare cutanată (și anume, prohaptene) nu pot fi detectate prin metoda de testare. Substanțe chimice care devin sensibilizante în urma transformării abiotice (și anume, prehaptene) sunt raportate în unele cazuri a fi corect identificate prin metoda de testare (18). Având în vedere considerațiile de mai sus, rezultatele negative obținute prin metoda de testare se interpretează în contextul limitelor menționate și în legătură cu alte surse de informații în cadrul unei IATA. Substanțele chimice de testat care nu se leagă covalent la peptidă, dar își promovează oxidarea (și anume, dimerizarea cisteinei) ar putea conduce la o posibilă supraestimare a depleției de peptidă, având ca rezultat posibile estimări fals pozitive și/sau atribuirea unei clase de reactivitate mai mare (a se vedea punctele 29 și 30).

Astfel cum a fost descris, DPRA sprijină diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante. Cu toate acestea, acesta poate, de asemenea, să contribuie la evaluarea potenței de sensibilizare (11) atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA. Sunt însă necesare lucrări suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina modalitatea în care rezultatele DPRA pot informa evaluarea potenței.

PRINCIPIUL TESTULUI

DPRA este o metodă *in chemico* care cuantifică concentrația de peptidă cisteină sau lizină rămasă după incubarea timp de 24 de ore cu substanța chimică de testat la 25 ± 2,5 °C. Peptidele sintetice conțin fenilalanină pentru a asista la detecție. Se măsoară concentrația relativă de peptidă prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu eluție în gradient și detecție UV la 220 nm. Valorile depleției procentului de peptidă cisteină și lizină sunt apoi calculate și utilizate într-un model predictiv (a se vedea punctul 29), care permite repartizarea substanței chimice de testat în una dintre cele patru clase de reactivitate utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante de cele nesensibilizante.

▼M7

Înainte de utilizarea sistematică a metodei descrise în prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele lor tehnice utilizând cele zece substanțe de verificare menționate în apendicele 2.

PROCEDURĂ

Această metodă de testare se bazează pe protocolul DPRA DB-ALM nr. 154 (20), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de validare coordonat de EURL ECVAM. Se recomandă utilizarea acestui protocol atunci când se pune în aplicare și se utilizează metoda în laborator. Componentele și procedurile principale pentru DPRA sunt descrise în continuare. În cazul în care se utilizează un alt dispozitiv HPLC, echivalența acestuia cu dispozitivul validat descris în protocol DB-ALM trebuie să fie demonstrată (de exemplu, prin testări ale substanțelor de verificare din apendicele 2).

Pregătirea peptidelor care conțin cisteină sau lizină

Soluțiile mamă de peptide sintetice care conțin cisteină (Ac-RFAA**C**AA-COOH) și lizină (Ac-RFAA**K**AA-COOH) cu o puritate mai mare de 85 % și de preferință în plaja de valori 90-95 %, sunt proaspăt preparate, chiar înainte de incubarea cu substanța chimică de testat. Concentrația finală de peptidă cisteină trebuie să fie de 0,667 mM în tampon de fosfat cu pH 7,5 în timp ce concentrația finală de peptidă lizină trebuie să fie de 0,667 mM în tampon de acetat de amoniu cu pH 10,2. Secvența de funcționare a HPLC se configurează pentru a menține timpul de analiză HPLC mai puțin de 30 de ore. Pentru dispozitivul HPLC utilizat în studiul de validare și descris în prezenta metodă de testare, într-o singură determinare HPLC pot fi incluse până la 26 de probe de analiză (care includ substanța chimică de testat, martorul pozitiv și numărul corespunzător de martori solvent în funcție de numărul individual de solvenți utilizați în cadrul testului, fiecare testat în triplicat). Toate probele duplicat analizate în aceeași determinare utilizează soluții mamă de peptidă cisteină și lizină identice. Se recomandă testarea loturile individuale de peptide pentru solubilitate adecvată înainte de utilizarea acestora.

Prepararea substanței chimice de testat

Solubilitatea substanței chimice de testat într-un solvent adecvat se evaluează înainte de efectuarea testului, urmărind procedura descrisă în protocolul DPRA DB-ALM (20). Un solvent adecvat va dizolva substanța chimică de testat complet. Având în vedere faptul că în DPRA substanța chimică de testat se incubează în exces fie cu peptidele cisteină, fie cu cele lizină, inspecția vizuală a formării unei soluții clare este considerată suficientă pentru a stabili dizolvarea substanței chimice de testat (și a tuturor componentelor acesteia în cazul testării unei substanțe multicomponente sau un amestec). Solvenți adecvați sunt acetonitrilul, apă, 1: 1 amestec apă: acetonitril, izopropanol, acetonă sau 1: 1 amestec acetonă: acetonitril. Se pot utiliza alți solvenți atât timp cât aceștia nu au un impact asupra stabilității peptidei, astfel cum este monitorizată cu martori de referință C (și anume, probe constituite din peptida singură dizolvată în solvent adecvat; a se vedea apendicele 3). Ca o ultimă opțiune, în cazul în care substanța chimică de testat nu este solubilă în oricare dintre acești solvenți, se încearcă solubilizarea în 300 µl DMSO și se diluează soluția rezultată cu 2700 µl de acetonitril, iar, în cazul în care substanța chimică de testat nu este solubilă în acest amestec, se încearcă solubilizarea aceleiași cantități de substanță chimică de testat în 1500 µl de DMSO și se diluează soluția rezultată cu 1500 µl de acetonitril. Substanța chimică testată se cântărește în prealabil în flacoane de sticlă și se dizolvă imediat înainte de testare într-un solvent adecvat pentru a pregăti o soluție de 100 mM. În cazul amestecurilor și al substanțelor multicomponente cu compoziție cunoscută, se determină o puritate unică din suma proporției componentelor acestora (cu excepția apei) și se determină o masă moleculară unică aparentă prin luarea în considerare a maselor moleculare individuale ale fiecărui component al amestecului (cu excepția apei) și proporțiile lor individuale. Puritatea și greutatea moleculară aparentă rezultate sunt utilizate apoi

▼M7

pentru a calcula cantitatea de substanță chimică de testat necesară pentru a pregăti o soluție de 100 mM. În cazul polimerilor a căror masă moleculară predominantă nu poate fi determinată, se poate lua în considerare masa moleculară a monomerului (sau greutatea moleculară a diverșilor monomeri care constituie polimerul) pentru a se prepara o soluție de 100 mM. Cu toate acestea, atunci când se testează amestecuri, substanțe multicomponente sau polimeri cu compoziție cunoscută, se ia în considerare, de asemenea, testarea substanței chimice pure. În cazul substanțelor lichide, substanța chimică pură se testează ca atare, fără nicio diluție în prealabil prin incubarea la raport molar 1:10 și 1:50 cu peptidele cisteină și, respectiv, peptidele lizină. În cazul substanțelor solide, substanța chimică de testat se dizolvă la concentrația maximă solubilă în același solvent utilizat pentru pregătirea soluției aparente de 100 mM. Se testează în continuare ca atare, fără orice diluție suplimentară, prin incubarea la raport 1:10 și 1:50 cu peptidele cisteină și respectiv, peptidele lizină. Rezultatele concordante (reactive sau nereactive) dintre soluția aparentă de 100 mM și substanța chimică pură permit o concluzie definitivă cu privire la rezultat.

Pregătirea martorilor pozitivi, a martorilor de referință și a martorilor de coeluție

Aldehida cinamică (CAS 104-55-2; de puritate alimentară ≥ 95 %) se utilizează ca martor pozitiv (MP) la o concentrație de 100 mM în acetonitril. Pot fi utilizați alți martori pozitivi adecvați, de preferință care să furnizeze valori medii de epuizare, în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a determinării. În plus, în secvența de determinare HPLC se includ, de asemenea, martori de referință (și anume, probe care conțin doar peptida dizolvată în solventul corespunzător) și aceștia sunt utilizați pentru a verifica caracterul adecvat al sistemului HPLC înainte de analiză (martori de referință A), stabilitatea în timp a martorilor de referință (martori de referință B) și pentru a verifica dacă solventul utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat nu are un impact asupra procentului de depleție de peptidă (martori de referință C) (a se vedea apendicele 3). Martorul de referință corespunzător pentru fiecare substanță chimică este utilizat pentru a calcula procentul de depleție de peptidă pentru substanța chimică respectivă (a se vedea punctul 26). În plus, un martor de coeluție constituit doar din substanța chimică de testat, pentru fiecare dintre substanțele chimice de testat analizate se include în secvență de determinare pentru a detecta posibila coeluție a substanței chimice de testat fie cu peptida lizină, fie cu peptida cisteină.

Incubarea substanței chimice de testat cu soluțiile de peptidă lizină și cisteină

Soluțiile de peptidă cisteină și lizină se incubează în flacoane de sticlă cu autoprelevare de probe cu substanța chimică de testat la raport 1:10 și, respectiv, 1:50. Dacă se observă un precipitat imediat după adăugarea soluției de substanță chimică de testat în soluția de peptidă din cauza gradului redus de solubilitate în apă a substanței chimice de testat, atunci nu se poate cunoaște în mod sigur cantitatea de substanță chimică de testat rămasă în soluție pentru a reacționa cu peptida. Prin urmare, într-un astfel de caz, un rezultat pozitiv ar putea fi încă utilizat, dar un rezultat negativ este incert și se interpretează cu prudență [a se vedea, de asemenea, prevederile de la punctul 11 pentru testarea substanțelor chimice care nu sunt solubile până la o concentrație de 100 mM]. Soluția de reacție se lasă la întuneric, la 25 ± 2,5 °C, timp de 24±2 ore, înainte de a efectua analiza HPLC. Fiecare substanță chimică de testat se analizează în triplicat pentru ambele peptide. Probele se inspectează vizual înainte de analiza HPLC. În cazul în care se observă un precipitat sau o separare a fazelor, probele se pot supune centrifugării la viteză redusă (100-400xg) pentru a forța precipitatul la fundul flaconului ca măsură de precauție, deoarece cantitățile mari de precipitat pot bloca tuburile sau coloanele HPLC. În cazul în care se observă un precipitat sau o separare a fazelor după perioada de incubație, depleția peptidei ar putea fi subestimată, iar o concluzie privind lipsa de reactivitate nu poate fi stabilită cu suficientă încredere în cazul unui rezultat negativ.

▼M7

Pregătirea curbei standard de etalonare HPLC

Se generează o curbă de etalonare standard atât pentru peptida cisteină, cât și pentru cea lizină. Standardele de peptide se prepară într-o soluție de 20 % sau 25 % acetonitril: se tamponează utilizând soluție tampon fosfată (pH 7,5) pentru peptida cisteină și soluția tampon de acetat de amoniu (pH 10,2) pentru peptida lizină. Utilizând standarde de diluție în serie a soluției mamă de peptidă (0,667 mM), se prepară 6 soluții de calibrare pentru a acoperi plaja de valori de la 0,534 până la 0,0167 mM. Un martor al tamponului de diluție se include, de asemenea, în curba standard de etalonare. Curbele de etalonare corespunzătoare trebuie să aibă $r^2 > 0,99$.

Pregătirea și analiza HPLC

Caracterul adecvat al sistemului HPLC se verifică înainte de efectuarea analizei. Depleția de peptidă este monitorizată prin HPLC cuplată cu un detector UV (detector cu grup de fotodiode sau detector cu lungime de undă fixă de absorbanță cu un semnal de 220 nm). Coloana corespunzătoare este instalată în sistemul HPLC. Dispozitivul HPLC descris în protocoalele validate utilizează, de preferință, o coloană Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm x 3,5 microni. Cu această coloană HPLC cu fază inversă, întregul sistem se echilibrează la 30 °C cu faza A 50 % [0,1 % (v/v) acid trifloroacetic în apă] și faza B 50 % [0,085 % (v/v) acid trifloroacetic în acetonitril) timp de cel puțin 2 ore înainte de funcționare. Analiza HPLC se efectuează utilizând un debit de 0,35 ml/min și un gradient liniar de la 10 % până la 25 % acetonitril peste 10 minute, urmat de o creștere rapidă la 90 % acetonitril pentru a îndepărta alte materiale. Se injectează volume egale din fiecare standard, probă și martor. Coloana se reechilibrează conform condițiilor inițiale timp de 7 minute între injectări. În cazul în care se utilizează o coloană HPLC cu fază inversă diferită, parametrii descriși mai sus ar putea necesita modificări pentru a garanta un nivel adecvat de eluare și integrare a peptidelor cisteină și lizină, inclusiv volumul de injecție, care poate varia în funcție de sistemul utilizat (în mod obișnuit, în plaja de valori 3-10 µl). În cazul în care se utilizează un alt dispozitiv HPLC, este important să se demonstrează echivalența acestuia cu dispozitivul validat descris mai sus (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2). Absorbanța se monitorizează la 220 nm. În cazul în care se utilizează un detector cu grup de fotodiode, se înregistrează, de asemenea, absorbanța la 258 nm. Se remarcă faptul că unele administrări de acetonitril ar putea avea un impact negativ asupra stabilității peptidei și acest lucru trebuie evaluat atunci când se utilizează un lot nou de acetonitril. Raportul dintre aria picului 220 și aria picului 258 poate fi utilizat ca indicator al coeluției. Pentru fiecare probă, un raport care se încadrează în plaja de valori 90 % < raportul mediu ([1]) al ariei probelor martor < 100 % ar furniza un indicator puternic conform căruia coeluția nu a avut loc.

Pot exista substanțe chimice de testat care ar putea promova oxidarea peptidei cisteină. Picul peptidei cisteină dimerizată poate fi monitorizat vizual. În cazul în care dimerizarea pare să fi avut loc, acest lucru se menționează întrucât procentul de depleție de peptidă poate fi supraestimat, ceea ce conduce la estimări fals pozitive și/sau încadrarea într-o clasă de reactivitate mai ridicată (a se vedea punctele 29 și 30).

Analiza HPLC pentru peptidele cisteină și lizină poate fi efectuată simultan (în cazul în care sunt disponibile două sisteme HPLC) sau în zile diferite. În cazul în care analiza se realizează în zile diferite, atunci toate soluțiile de substanță chimică de testat trebuie să fie proaspăt pregătite pentru ambele teste, în fiecare zi. Analiza se planifică astfel încât să se asigure că injectarea primei probe începe cu 22 până la 26 de ore după amestecul substanței chimice de testat cu soluția de peptidă. Secvența de determinare a HPLC se configurează

([1]) Prin mediu se înțelege media aritmetică în întregul document.

▼M7

pentru a menține timpul de analiză HPLC sub 30 de ore. Pentru dispozitivul HPLC utilizat în studiul de validare și descris în prezenta metodă de testare, într-o singură determinare HPLC pot fi incluse până la 26 de probe de analiză (a se vedea, de asemenea, punctul 17). Un exemplu de secvență de analiză HPLC este prevăzut în apendicele 3.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

Concentrația de peptidă cisteină sau lizină se determină fotometric la 220 nm în fiecare probă prin măsurarea ariei picului [aria de sub curbă (ASC)] pentru picurile corespunzătoare și prin calcularea concentrației de peptidă utilizând curba de etalonare liniară obținută din standarde.

Procentul de depleție de peptidă se determină din fiecare probă prin măsurarea ariei picului și împărțirea acesteia la aria medie a picului martorilor de referință C relevanți (a se vedea apendicele 3) conform formulei descrise mai jos.

$$\textit{Procentul de depleție de peptidă} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Aria picului de peptidă în injecția replică}}{\textit{Media ariei picului de peptidă în martorii de referință}}\right)\right] \times 100$$

Criterii de acceptare

Următoarele criterii trebuie îndeplinite pentru ca o determinare să fie considerată valabilă:

a) curba de etalonare standard trebuie să aibă r^2>0,99;

b) valoarea medie a procentului de depleție de peptidă a celor trei duplicate pentru aldehida cinamică martor pozitiv trebuie să fie cuprins între 60,8 % și 100 % pentru peptida cisteină și între 40,2 % și 69,0 % pentru peptida lizină, iar deviația standard maximă (DS) pentru duplicatele martor pozitiv trebuie să fie <14,9 % pentru procentul de depleție de cisteină și <11,6 % pentru procentul de depleție de lizină și

c) concentrația medie de peptidă a martorilor de referință A trebuie să fie de 0,50± 0,05 mM și coeficientul de variație (CV) a ariile picurilor peptidei celor nouă martori de referință B și C în acetonitril trebuie să fie < 15,0 %.

În cazul în care unul sau mai multe dintre aceste criterii nu este îndeplinit, determinarea se repetă.

Următoarele criterii trebuie îndeplinite pentru ca rezultatele unei substanțe chimice de testat să fie considerate valabile:

a) deviația standard maximă pentru probele duplicat ale substanței chimice de testat trebuie să fie <14,9 % pentru procentul de depleție de cisteină și <11,6 % pentru procentul de depleție de lizină,

b) concentrația medie de peptidă a celor trei martori de referință C în solvent adecvat trebuie să fie de 0,50±0,05 nM. În cazul în care aceste criterii nu sunt îndeplinite, datele se resping și determinarea se repetă pentru respectiva substanță chimică de testat.

Model predictiv

Valoarea medie a procentului de depleție de cisteină și lizină se calculează pentru fiecare substanță chimică de testat. Depleția negativă este considerată ca fiind „0” atunci când se calculează valoarea medie. Prin utilizarea modelului predictiv cisteină 1: 10/lizină 1: 50 prezentat în tabelul 1, pragul de 6,38 % de depleție medie de peptidă se utilizează pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în cadrul unei IATA. Aplicarea modelului predictiv pentru încadrarea unei substanțe chimice de testat într-o clasă de reactivitate (de exemplu, reactivitate redusă, moderată și ridicată) se poate dovedi utilă pentru a furniza informații cu privire la evaluarea potenței în cadrul unei IATA.

▼M7

Tabelul 1

Model predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50 ([1])

Valoarea medie a % de depleție de cisteină și lizină	Clasa de reactivitate	Estimare DPRA ([2])
0 % ≤ % depleție medie ≤ 6,38 %	Reactivitate zero sau minimă	Negativă
6,38 % < % depleție medie ≤ 22,62 %	Reactivitate scăzută	Pozitivă
22,62 % < % depleție medie ≤ 42,47 %	Reactivitate moderată	
42,47 % < % depleție medie ≤ 100 %	Reactivitate ridicată	

([1]) Cifrele se referă la valorile prag generate din punct de vedere statistic și nu sunt legate de gradul de precizie al metodei de măsurare.
([2]) O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 12.

Pot exista cazuri în care substanța chimică de testat (substanța sau unul sau mai multe dintre componentele unei substanțe multicomponentă sau un amestec) absoarbe în mod semnificativ la 220 nm și are același timp de retenție ca peptida (coeluție). Coeluția poate fi soluționată printr-o ușoară ajustare a dispozitivului HPLC pentru a separa în continuare timpul de eluție al substanței chimice de testat și al peptidei. În cazul în care se utilizează alt dispozitiv HPLC pentru a încerca soluționarea coeluției, este necesară demonstrarea echivalenței acestuia cu dispozitivul validat (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2). Atunci când se produce coeluția, picul peptidei nu poate fi integrat și calcularea procentului de depleție a peptidei nu este posibilă. În cazul în care coeluția unor astfel de substanțe chimice de testat se produce cu peptidele cisteină și lizină, analiza se raportează ca „neconcludentă”. În cazurile în care coeluția se produce numai cu peptida lizină, se poate utiliza modelul predictiv cisteină 1:10 raportat în tabelul 2.

Tabelul 2

Model predictiv cisteină 1:10 ([1])

% de depleție de cisteină (cis)	Clasa de reactivitate	Estimare DPRA ([2])
0 % ≤ % depleție cis ≤ 13,89 %	Reactivitatea zero sau minimă	Negativă
13,89 % < % depleție cis ≤ 23,09 %	Reactivitatea scăzută	Pozitivă
23,09 % < % depleție cis ≤ 98,24 %	Reactivitatea moderată	
98,24 % < % depleție cis ≤ 100 %	Reactivitate ridicată	

([1]) Cifrele se referă la valorile prag generate din punct de vedere statistic și nu sunt legate de gradul de precizie al metodei de măsurare.
([2]) O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 12.

Ar putea exista alte cazuri în care suprapunerea în ceea ce privește timpul de retenție dintre substanța chimică de testat și oricare dintre peptide este incomplet. În astfel de cazuri, valorile procentului de depleție de peptidă pot fi estimate și utilizate în modelul predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50, cu toate că încadrarea substanței chimice de testat într-o clasă de reactivitate nu poate fi efectuată cu precizie.

▼M7

O singură analiză HPLC pentru ambele peptide cisteină și lizină este suficientă pentru o substanță chimică de testat atunci când rezultatul este fără echivoc. Cu toate acestea, în cazul unor rezultate apropiate de pragul utilizat pentru a se face diferența între rezultatele pozitive și negative (și anume, rezultate limită) pot fi necesare teste suplimentare. În situații în care procentul mediu de depleție se încadrează în intervalul 3 %- 10 % pentru modelul predictiv cisteină 1:10/lizină 1:50 sau procentul de depleție de cisteină se încadrează în plaja de valori 9 %- 17 % pentru modelul predictiv cisteină 1:10, se ia în considerare o a doua determinare, precum și o a treia, în cazul unor rezultate discordante între primele două determinări.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

— Substanță monocomponentă

  — Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă, greutatea moleculară, precum și proprietățile fizicochimice relevante suplimentare, în măsura în care sunt disponibile;

  — Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

  — Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

  — Concentrația (concentrațiile) testată(e);

  — Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil.

— Substanță multicomponentă, UVCB și amestec:

  — Caracterizarea, în măsura în care este posibil, de exemplu, identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, în măsura în care este posibil;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare, în măsura în care este posibil;

  — Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

  — Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

  — Concentrația (concentrațiile) testată(e);

  — Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil.

Martori

— Martor pozitiv

  — Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară, precum și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare, în măsura în care sunt disponibile;

  — Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

▼M7

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care să demonstreze criterii adecvate de acceptare a determinării, dacă este cazul.

— Solvent/vehicul

— Solventul/vehiculul utilizat și raportul componentelor acestuia, dacă este cazul;

— Identificarea (identificările) chimică(e), precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) CAS și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectului fizic, greutatea moleculară și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare în cazul în care se utilizează alți solvenți/vehicule decât cei menționați în metoda de testare și în măsura în care este posibil;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil;

— Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat;

— Pentru acetonitril, rezultatele testului de impact asupra stabilității peptidice.

Pregătirea peptidelor, a martorului pozitiv și a substanței chimice de testat

— Caracterizarea soluțiilor de peptidă (furnizor, lot, greutatea exactă a peptidei, volumul de soluție mamă adăugat);

— Caracterizarea soluției martor pozitiv (greutatea exactă a substanței martor pozitiv, volumul de soluție de testat adăugat);

— Caracterizarea soluțiilor de substanță chimică de testat (greutatea exactă a substanței chimice de testat, volumul de soluție de testat adăugat).

Reglajele instrumentelor și analiza HPLC

— Tipul de instrument HPLC, coloane HPLC și de protecție, detector, dispozitiv cu prelevare automată a probelor;

— Parametrii relevanți pentru analiza HPLC, precum temperatura coloanei, volumele de injecție, debitul și gradientul.

Adecvarea sistemului

— Aria picului peptidei la 220 nm a fiecărui replicat standard și martor de referință A;

— Curbă de etalonare liniară reprezentată grafic și r^2 raportată;

— Concentrația de peptidă a fiecărui replicat de martor de referință A;

— Concentrația medie de peptidă (mM) a celor trei martori de referință, DS și CV;

— Concentrația de peptidă a martorilor de referință A și C.

▼M7

Secvența de analiză

— Pentru martorii de referință:

  — Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărui replicat B și C;

  — Aria medie a picului de peptidă la 220 nm a celor nouă martori de referință B și C în acetonitril, DS și CV (pentru stabilitatea martorilor de referință pe timpul analizei);

  — Pentru fiecare solvent utilizat, aria medie a picului de peptidă la 220 nm a celor trei martori de referință C corespunzători (pentru calcularea procentului de depleție de peptidă);

  — Pentru fiecare solvent utilizat, concentrația de peptidă (mM) a celor trei martori de referință corespunzători C;

  — Pentru fiecare solvent utilizat, concentrația medie de peptidă (mM) a celor trei martori de referință corespunzători C, DS și CV.

— Pentru martorul pozitiv:

  — Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărei replici;

  — Procentul de depleție de peptidă a fiecărei replici;

  — Procentul mediu de depleție a celor trei replici, DS și CV.

— Pentru fiecare substanță chimică de testat:

  — Aspectul precipitatului în amestecul de reacție la sfârșitul perioadei de incubație, dacă se observă. Dacă precipitatul a fost resolubilizat sau centrifugat;

  — Prezența coeluției;

  — O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul;

  — Aria picului de peptidă la 220 nm a fiecărei replici;

  — Procentul de depleție de peptidă a fiecărei replici;

  — Procentul mediu de depleție de peptidă a celor trei replici, DS și CV;

  — Valorile medii a procentului de depleție de cisteină și depleție de lizină;

  — Modelul predictiv utilizat și estimarea DPRA.

Verificarea competenței

— Dacă este cazul, procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța de reproductibilitate a metodei de testare în timp.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodei de testare DPRA;

— Discutarea rezultatelor metodei de testare în contextul unei IATA, în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzie

▼M7

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Partea 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.

(4) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Testul local pe ganglioni limfatici

(5) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: DA.

(6) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: BrdU-ELISA

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponibil la: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74p. Disponibil la: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17p. Disponibil la: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22p. Disponibil la: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanță” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul de „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (21).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): O serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare de la evenimentul declanșator molecular până la un răspuns *in vivo* de interes (2).

Curba de etalonare: Relația dintre valoarea experimentală de răspuns și concentrația analitică (denumită, de asemenea, *curbă standard*) a unei substanțe cunoscute.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Coeficient de variație: O măsură a variabilității care se calculează pentru un grup de date replicate prin împărțirea deviației standard la valoarea medie. Aceasta poate fi multiplicată cu 100 pentru exprimarea în procent.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizării pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează din punct de vedere strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Eveniment declanșator molecular: Perturbație provocată de o substanță chimică unui sistem biologic la nivel molecular, identificată ca fiind evenimentul inițiator al evoluției răspunsurilor adverse.

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe în care acesteanu reacționează (1).

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în măsură de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Martor pozitiv: O probă replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că induce o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Martor de referință: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem testat, inclusiv solventul sau vehiculul care este analizat împreună cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a stabili nivelul de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același

▼M7

solvent sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul studiat și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Acesta reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (21).

Fiabilitate: Măsurile în care o metodă de testare poate fi efectuată în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuată utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (21).

Reproductibilitate: Acordul dintre rezultatele obținute în urma testării aceleiași substanțe chimice, utilizând același protocol de testare (a se vedea fiabilitatea) (21).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (21).

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (21).

Substanță: Elemente chimice și compușii lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (1).

Adecvarea sistemului: Determinarea performanței instrumentului (de exemplu, sensibilitatea) prin analiza unui standard de referință înainte de trece la lotul analitic (22).

Substanță chimică de testat: Termenul „substanță chimică de testat” se utilizează pentru a se face referință la ceea ce este testat.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

Metoda de testare valabilă: O metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. O metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (21).

▼M7

Apendicele 2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Sensibilizare cutanată *in chemico*: Testul reactivității directe a peptidelor

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin obținerea în mod corect a estimărilor DPRA preconizate pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea valorilor de depleție de cisteină și lizină care se încadrează în plajele de valori de referință respective pentru 8 din cele 10 substanțe de verificare pentru fiecare peptidă. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta plaja de valori a rezultatelor pentru pericolele de sensibilizare cutanată. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea în comerț, disponibilitatea de date de referință *in vivo* de calitate superioară și de date *in vitro* de calitate superioară generate cu DPRA și faptul că acestea au fost utilizate în studiul de validare coordonat de EURL ECVAM pentru a demonstra punerea în aplicare cu succes a metodei de testare în laboratoarele participante la studiu.

Tabelul 1

Substanțe de verificare recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin testul reactivității directe a peptidelor

Substanțe de verificare	NR. CAS	Starea fizică	Estimare *in vivo* [1]	Estimare DPRA [2]	Intervalul [3]de % depleție de peptidă cisteină	Intervalul [3] de % depleție de peptidă lizină
2,4-dinitroclor-benzen	97-00-7	Solidă	Sensibilizant (extrem)	Pozitivă	90-100	15-45
Oxazolonă	15646-46-5	Solidă	Sensibilizantă (extrem)	Pozitivă	60-80	10-55
Formaldehidă	50-00-0	Lichidă	Sensibilizantă (puternic)	Pozitivă	30-60	0-24
Benziliden acetonă	122-57-6	Solidă	Sensibilizantă (moderat)	Pozitivă	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Lichidă	Sensibilizantă (redus)	Pozitivă	15-55	0-25
2,3-Butandionă	431-03-8	Lichidă	Sensibilizantă (redus)	Pozitivă	60-100	10-45
1-butanol	71-36-3	Lichidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5
6-Metilcumarină	92-48-8	Solidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5
Acid lactic	50-21-5	Lichidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5
4-metoxiacetofenonă	100-06-1	Solidă	Nesensibilizantă	Negativă	0-7	0-5,5

([1]) Pericolele și (potența) estimărilor *in vivo* se bazează pe datele LLNA (19). Potența *in vivo* se calculează pe baza criteriilor propuse de ECETOC (23).
([2]) O estimare DPRA se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11.
([3]) Intervale determinate pe baza a cel puțin 10 valori de depleție generate de 6 laboratoare independente.

▼M7

Apendicele 3

EXEMPLE DE SECVENȚĂ DE ANALIZĂ

Standarde de calibrare și martori de referință	STD 1 STD 2 STD 3 STD 4 STD 5 STD 6 Soluție tampon de diluție Martor de referință A, rep 1 Martor de referință A, rep 2 Martor de referință A, rep 3
Martori de coeluție	Martor de coeluție 1 pentru substanța chimică de testat 1 Martor de coeluție 2 pentru substanța chimică de testat 2
Martori de referință	Martor de referință B, rep1 Martor de referință B, rep 2 Martor de referință B, rep 3
Primul set de replici	Martor de referință C, rep1 Aldehidă cinamică, rep1 Proba 1, rep 1 Proba 2, rep 1
Al doilea set de replici	Martor de referință C, rep 2 Aldehidă cinamică, rep 2 Proba 1, rep 2 Proba 2, rep 2
Al treilea set de replici	Martor de referință C, rep 3 Aldehidă cinamică, rep 3 Proba 1, rep 3 Proba 2, rep 3
Martori de referință	Martor de referință B, rep 4 Martor de referință B, rep 5 Martor de referință B, rep 6

În secvența de analiză se includ trei seturi de martori de referință (și anume, probe constituite numai din peptidă dizolvată în solventul adecvat):
Martorul de referință A: utilizat pentru a verifica adecvarea sistemului HPLC.
Martorul de referință B: inclus la începutul și la sfârșitul secvenței de analiză pentru a verifica stabilitatea martorilor de referință în timpul analizei.
Martorul de referință C: inclus în secvența de analiză pentru a verifica dacă solventul utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat nu are un impact asupra procentului de depleție de peptidă.

▼M7

B.60. SENSIBILIZARE CUTANATĂ *IN VITRO*: METODA DE TESTARE A ERA-NRF2 ALE LUCIFERAZEI

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 442D (2015). O substanță sensibilizantă pentru piele se referă la o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definită în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). Această metodă de testare furnizează o procedură *in vitro* (testul ERA- Nrf2 ale luciferazei) care poate să fie utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU (1) și CLP.

Există un acord general cu privire la principalele evenimentele biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente despre mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (Adverse Outcome Pathway – AOP) (2), începând de la evenimentul declanșator molecular, la evenimentele intermediare până la efectele adverse asupra sănătății, și anume dermatita alergică de contact la oameni sau hipersensibilitatea de contact la rozătoare (2) (3). Evenimentul declanșator molecular este legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile ale proteinelor din piele. Al doilea eveniment important în acest AOP se desfășoară în cheratinocite și include răspunsuri inflamatorii, precum și expresia genică asociată cu parcursurile de semnalizare de celule specifice, precum parcursurile care depind de elemente de răspuns antioxidant/electrofil (ERA). Al treilea eveniment important este activarea celulelor dendritice, de regulă evaluate prin exprimarea markerilor celulari de suprafață specifici, chemochine și citocine. Al patrulea eveniment important este proliferarea celulară T, care este evaluată în mod indirect în testul local asupra ganglionilor limfatici de la murini (4).

Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, în general, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice bazate pe cobai, testul de maximizare Magnusson și Kligman (GMPT), testul Buehler [(MT B.6 (5)] studiază atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Un test pe murini, testul local asupra ganglionilor limfatici (LLNA) [MT B.42 (4)] și cele două variante ale sale neradioactive, LLNA: DA [MT B.50 (6)] și LLNA: BrdU-ELISA [MT B.51 (7), care toate evaluează în mod exclusiv reacția de inducție, au beneficiat, de asemenea, de acceptare, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punct de vedere al bunăstării animalelor și măsurarea obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

Mai recent, metode de testare pe bază mecanică *in chemico* și *in vitro* au fost considerate valabile din punct de vedere științific pentru evaluarea pericolelor de sensibilizare cutanată ale substanțelor chimice. Cu toate acestea, vor fi necesare combinații de metode care nu se bazează pe animale (*in silico, in vitro, in chemico*) în cadrul strategiilor integrate de testare și evaluare (Integrated Approaches to Testing and Assessment – IATA) pentru a putea înlocui complet testele pe animale utilizate în prezent, având în vedere gradul restrâns de acoperire automată al AOP al fiecărei metode de testare care nu implică animale, disponibilă în prezent (2) (3).

Această metodă de testare (testul ERA-Nrf2 ale luciferazei) este propusă pentru a aborda al doilea eveniment important, astfel cum se explică la punctul 2. Substanțele sensibilizante pentru piele au fost raportate ca determinând gene care sunt reglementate de elementul de răspuns antioxidant (ERA) (8) (9). Substanțele electrofile mici precum substanțele sensibilizante pentru piele pot

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

▼M7

acționa asupra proteinei senzor Keap1 (proteina 1 kelch asociată cu epiclorhidrina) prin, de exemplu, modificarea covalentă a reziduurilor de cisteină, având ca rezultat disocierea acestora de factorul de transcripție Nrf2 (factor 2 nuclear legat de factorul eritroidului 2). Nrf2 disociat poate ulterior să activeze gene dependente de ERA, precum cele care codează pentru faza II a enzimelor detoxifiante (8) (10) (11).

În prezent, singurul test *in vitro* ERA-Nrf2 ale luciferazei reglementat de prezenta metodă de testare este testul KeratinoSens™ pentru care au fost finalizate studiile de validare (9) (12) (13), urmate de o evaluare independentă inter pares efectuată de laboratorul de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (EURL ECVAM) (14). Testul KeratinoSens™ a fost considerat valabil din punct de vedere științific pentru a fi utilizat ca parte a unei IATA, pentru a sprijini diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în scopul clasificării pericolelor și etichetării (14). Laboratoarelor care doresc să pună în aplicare metoda de testare pot obține linia celulară recombinantă utilizată în testul KeratinoSens™ prin instituirea unui acord de licență cu dezvoltatorul metodei de testare (15).

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

CONSIDERAȚII INIȚIALE, APLICABILITATE ȘI LIMITĂRI

Având în vedere faptul că activarea parcursului ERA-Nrf2-keap 1 se referă doar la al doilea eveniment important al AOP privind sensibilizarea cutanată, este puțin probabil ca informațiile de la metodele de testare bazate pe activarea acestui parcurs să fie suficiente atunci când sunt utilizate singure pentru a concluziona în privința potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele generate în cadrul acestei metode de testare se iau în considerare în contextul unor abordări integrate precum IATA, în combinație cu alte informații complementare, de exemplu obținute din testele *in vitro*, care abordează alte evenimente importante ale AOP privind sensibilizarea cutanată, precum și prin metode care nu fac recurs la testări, inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoage. Exemple privind modalitatea de utilizare a metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei în combinație cu alte informații sunt raportate în referințele bibliografice (13) (16) (17) (18) (19).

Această metodă de testare poate fi utilizată pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și cele nesensibilizante în contextul IATA. Această metodă de testare nu poate fi utilizată în mod independent, nici cu scopul de a subcategoriza substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite de GHS al ONU/Regulamentul CLP, nici pentru a efectua estimări cu privire la potența pentru decizii în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, un rezultat pozitiv poate fi utilizat singur pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

Pe baza setului de date din studiul de validare și testarea internă utilizată pentru evaluarea inter pares independentă a metodei de testare, testul KeratinoSens™ s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în cultură celulară. Nivelul de reproductibilitate în estimări care poate fi preconizat din metoda de testare este de ordinul a 85 % în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare (14). Precizia (77 % – 155/201), sensibilitatea (78 % – 76 %) și specificitatea (76 % -84/110) testului KeratinoSens™ pentru diferențierea substanțelor sensibilizante pentru piele (și anume, cat. 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de cele nesensibilizante în comparație cu rezultatele LLNA au fost calculate luând în considerare toate datele transmise EURL ECVAM pentru evaluarea propriu-zisă și evaluarea inter pares a metodei de testare (14). Aceste cifre sunt similare celor publicate recent pe baza testării interne a aproximativ 145

▼M7

de substanțe (acuratețe 77 %, sensibilitate 79 %, specificitate 72 %) (13). Testul KeratinoSens™ are mai multe șanse să subestimeze substanțele chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) față de substanțele chimice care prezintă un grad ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (13) (14). Luate împreună, aceste informații indică utilitatea testului KeratinoSens™ la contribuirea identificării pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de acuratețe furnizate în prezentul document pentru testul KeratinoSens™ ca metodă de testare de sine stătătoare sunt doar orientative, întrucât metoda de testare se ia în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unui IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 9 de mai sus. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată se ia în vedere faptul că LLNA, precum și alte teste pe animale nu pot reflecta pe deplin situația pentru specia de interes, și anume oamenii.

Termenul „substanță chimică de testat” este utilizată în prezenta metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei la testarea unor substanțe și/sau amestecuri. Pe baza datelor actuale disponibile, testul KeratinoSens™ s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost determinat prin intermediul studiilor *in vivo*) și proprietăți fizico-chimice (9) (12) (13) (14). În principal au fost testate substanțe monocomponente, cu toate că există, de asemenea, un volum limitat de date cu privire la testarea amestecurilor (20). Metoda de testare este aplicabilă, cu toate acestea, din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. În plus, atunci când se testează substanțe multicomponente sau amestecuri, se ia în considerare posibila interferență a componentelor citotoxice cu răspunsurile observate. Metoda de testare este aplicabilă substanțelor chimice de testat solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu decantează sau se separă de solvent în diferite faze), fie în apă sau în DMSO (inclusiv toate componentele substanței chimice de testat, în cazul testării unei substanțe multicomponente sau un amestec). Substanțele chimice de testat care nu îndeplinesc aceste condiții la concentrația maximă finală necesară de 2000 μM (a se vedea punctul 22) pot fi testate, cu toate acestea, la concentrații mai mici. Într-un astfel de caz, rezultatele care îndeplinesc criteriile de pozitivitate descrise la punctul 39 pot fi utilizate în continuare pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca sensibilizant al pielii, în timp ce un rezultat negativ obținut cu concentrații < 1000 μM se ia în considerare drept neconcludent (a se vedea modelul predictiv de la punctul 39). În general, substanțele cu log P de până la 5 au fost testate cu succes, în timp ce substanțele foarte hidrofobe cu log P cu o valoare de peste 7 se încadrează în afara aplicabilității cunoscute a acestei metode de testare (14). Pentru substanțele cu log P cuprins între 5 și 7, sunt disponibile informații limitate.

Rezultatele negative se interpretează cu prudență deoarece substanțele cu o reactivitate exclusivă față de reziduurile de lizină pot fi detectate ca fiind negative prin metoda de testare. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare utilizate (21), cât și din cauza condițiilor experimentale, prohaptenele (și anume, substanțele chimice care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P 450) și prehaptenele (și anume, substanțe chimice activate prin autooxidare), în special cele cu o rată de oxidare lentă pot furniza, de asemenea, rezultate negative. În același timp, substanțele chimice de testat care nu acționează ca un sensibilizant, dar care sunt, cu toate acestea, factori chimici de stres, pot conduce la rezultate fals pozitive (14). În plus, substanțele chimice de testat cu citotoxicitate ridicată nu pot fi evaluate întotdeauna într-o manieră fiabilă. În cele din urmă, substanțele chimice de testat care interferează cu enzima luciferază pot crea confuzii în activitatea luciferazei în testele pe bază de celule care provoacă fie o inhibare aparentă, fie o creștere a luminiscenței (22). De exemplu, concentrațiile de fitoestrogen mai mari de 1 μM au fost raportate a interfera cu semnalele de luminiscență ale altor teste a genei

▼M7

reporter pe bază de luciferază din cauza supraactivării genei luciferază reporter (23). În consecință, expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau substanțe chimice similare susceptibile de a produce supraestimare fitoestrogenică a genei luciferază reporter se examinează cu atenție (23). În cazul în care poate fi demonstrată existența unor dovezi privind lipsa de aplicabilitate a metodei de testare la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, metoda de testare nu se utilizează pentru respectivele categorii specifice.

În plus față de sprijinirea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante, testul KeratinoSens™ furnizează, de asemenea, informații cu privire la concentrație-răspuns care ar putea contribui la evaluarea potenței de sensibilizare atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA (19). Cu toate acestea, sunt necesare în continuare lucrări, de preferință bazate pe date provenite din studii pe subiecți umani fiabili, pentru a putea determina modul în care rezultatele testului KeratinoSens™ pot contribui la evaluarea potenței (24) și la subcategorizarea substanțelor sensibilizante în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda de testare a ARE-Nrf2 ale luciferazei utilizează o linie celulară imortalizată aderentă derivată din cheratinocite umane HaCaT transfectate cu o plasmidă selectabilă. Linia celulară conține gena luciferază sub controlul transcripțional al unui promotor constitutiv fuzionat cu un element ERA dintr-o genă despre care se cunoaște că este suprareglată de substanțe sensibilizante la contact (25) (26). Semnalul luciferazei reflectă activarea prin substanțe sensibilizante a genelor endogene dependente Nrf2 și dependența semnalului luciferazei în linia celulară recombinantă de proteina Nrf2 a fost demonstrată (27). Acest lucru permite măsurarea cantitativă (prin detecția de luminescență) a inducției genei luciferază, utilizând substraturi de luciferază bine stabilite ca indicator al activității factorului de transcripție Nrf2 în celule în urma expunerii la substanțe electrofile.

Substanțele chimice de testat sunt considerate pozitive în testul KeratinoSens™ în cazul în care acestea induc o inducție semnificativă din punct de vedere statistic a activității luciferazei peste un anumit prag (și anume, > 1,5 ori sau o creștere de 50 %), sub o concentrație definită care nu afectează în mod semnificativ viabilitatea celulară [și anume, sub 1000 μM și la o concentrație la care viabilitatea celulară este mai mare de 70 % (9) (12)]. În acest scop, se determină inducția maximă a activității luciferazei asupra martorului solvent (negativ) (I_{max}). În plus, având în vedere faptul că celulele sunt expuse la serii de concentrații ale substanțelor chimice de testat, concentrația necesară pentru o inducție semnificativă din punct de vedere statistic a activității luciferazei peste limita superioară a pragului (și anume, valoare $CE_{1,5}$) se interpolează din valoarea curbei dozărăspuns (a se vedea punctul 32 pentru calcule). În cele din urmă, se efectuează măsurători paralele de citotoxicitate pentru a se evalua dacă nivelurile de inducție de activitate a luciferazei apar la niveluri de concentrație sub nivelul de toxicitate.

Înainte de utilizarea sistematică a testului ERA-Nrf2 ale luciferazei care aderă la prezenta metodă de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii utilizând cele zece substanțe de verificare enumerate în apendicele 2.

Standarde de performanță (SP) (28) sunt disponibile pentru a facilita validarea unor metode de testare *in vitro* ale ERA-Nrf2 ale luciferazei noi sau modificate, similare cu testul KeratinoSens™ și permit modificarea la timp a acestei metode de testare pentru includerea acestora. Acceptarea reciprocă a datelor (ARD) în conformitate cu acordul OCDE va fi garantată doar pentru metodele de testare validate în conformitate cu SP, în cazul în care respectivele metode de testare au fost revizuite și incluse în orientarea OCDE privind testarea corespunzătoare.

▼M7

PROCEDURĂ

În prezent, singura metodă reglementată de prezenta metodă de testare este testul KeratinoSens™ valabil din punct de vedere științific (9) (12) (13) (14). Procedurile standard de operare (PSO) ale testului KeratinoSens™ sunt disponibile și se utilizează la punerea în aplicare și utilizarea metodei de testare în laborator (15). Laboratoarelor care doresc să pună în aplicare metoda de testare pot obține linia celulară recombinantă utilizată în testul KeratinoSens™ prin instituirea unui acord de licență cu dezvoltatorul metodei de testare. Următoarele alineate furnizează o descriere a principalelor componente și proceduri ale metodei de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei.

Pregătirea culturilor de cheratinocite

Se utilizează o linie celulară transgenică cu un nivel stabil de introgresie a genei luciferază reporter sub controlul unui element ERA (de exemplu, linia celulară KeratinoSens ™). În momentul primirii, se propagă celulele (de exemplu, de la 2 la 4 pasaje) și se depozitează înghețate ca stoc omogen. Celulele din acest stoc inițial pot fi propagate până la un număr maxim de pasaje (și anume, 25 în cazul KeratinoSens™) și se utilizează pentru testele de rutină cu ajutorul mediului de întreținere corespunzător (în cazul KeratinoSens™, aceasta reprezintă DMEM care conține ser și geneticină).

Pentru testări, celulele trebuie să fie confluente în proporție de 80-90 % și se acordă o atenție deosebită pentru se asigura ca celulele să nu fie cultivate până la confluență completă. Cu o zi înainte de testare, se recoltează celulele și se distribuie în plăci cu 96 de godeuri (10 000 celule/godeu în cazul KeratinoSens™).Se acordă atenție deosebită pentru a evita sedimentarea celulelor în timpul însămânțării cu scopul de a asigura distribuția omogenă a numărului de celule în godeuri. În caz contrar, această etapă poate genera variabilitate ridicată de la godeu la godeu. Pentru fiecare repetare se utilizează trei replici pentru măsurătorile activității luciferazei și o replică pentru testul de viabilitate celulară.

Pregătirea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

Substanța chimică de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru testul KeratinoSens™, substanțele chimice de testat se dizolvă în dimetilsulfoxid (DMSO) la concentrația finală dorită (de exemplu, 200 mM).Soluțiile de DMSO pot fi considerate autosterilizatoare, astfel încât filtrarea sterilă nu este necesară. Substanța chimică de testat care nu este solubilă în DMSO se dizolvă în apă sterilă sau mediu de cultură, iar soluțiile se sterilizează, de exemplu, prin filtrare. În cazul unei substanțe chimice de testat care nu are o masă moleculară (Mw) definită, se prepară o soluție mamă la o concentrație prestabilită [40 mg/mL sau 4 % (g/v)]în testul KeratinoSens™.În cazul în care se utilizează alți solvenți decât DMSO, apă sau mediu de cultură, este necesară furnizarea de justificări științifice suficiente.

În funcție de soluțiile mamă DMSO ale substanței chimice de testat, se realizează diluții repetate utilizând DMSO pentru a obține12 concentrații de bază ale substanței chimice care urmează să fie testată (de la 0,098 la 200 mM în testul KeratinoSens™). În cazul unei substanțe chimice de testat care nu este solubilă în DMSO, diluțiile utilizate pentru a obține concentrațiile de bază se efectuează utilizând apă sterilă sau un mediu de cultură steril. Independent de solventul utilizat, se diluează ulterior concentrațiile de bază de 25 de ori în mediu de cultură care conține ser și, în cele din urmă, se utilizează pentru tratamentul cu un factor de diluție suplimentar de 4 ori astfel încât concentrațiile finale de substanță chimică de testat să se încadreze într-o plajă de valori de la 0,98 la 2000 μM în testul KeratinoSens™. Se pot utiliza concentrații alternative pe baza unei justificări (de exemplu, în cazul citotoxicității sau al solubilității scăzute).

Martorul negativ (solvent) utilizat în testul KeratinoSens™ este DMSO (Nr. CAS 67-68-5, puritate ≥ 99 %), pentru care se pregătesc șase godeuri pentru fiecare placă. Acesta suferă aceeași diluție descrisă pentru concentrațiile de bază de la punctul 22, astfel încât concentrația finală de martor negativ (solvent) este de

▼M7

1 %, despre care se știe că nu afectează viabilitatea celulară și este corespunzătoare cu aceeași concentrație de DMSO a substanței chimice de testat și a martorului pozitiv. În cazul unei substanțe chimice de testat care nu este solubilă în DMSO, pentru care se efectuează diluții în apă, nivelul de DMSO în toate godeurile soluției finale de testat trebuie ajustat la 1 %, la fel ca pentru celelalte substanțe chimice de testat și substanțe martor.

Martorul pozitiv utilizat în cazul testului KeratinoSens™ este aldehida cinamică (Nr. CAS 14371-10-9, puritate ≥ 98 %), pentru care o serie de 5 concentrații de bază variind de la 0,4 la 6,4 mM se pregătesc în DMSO (de la soluție mamă de 6,4 mM) și se diluează astfel cum este descris pentru concentrațiile de bază de la punctul 22, astfel încât concentrația finală a martorului pozitiv să se încadreze într-o plajă de valori de la 4 la 64 μM. Se pot utiliza alți martori pozitivi adecvați, de preferință care să furnizeze valori medii $CE_{1,5}$ în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii de acceptare a utilizării comparabile.

Aplicarea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

Pentru fiecare substanță chimică de testat și substanță martor pozitiv este necesar un experiment pentru a obține o estimare (pozitivă sau negativă), constituită din cel puțin două repetări independente, fiecare conținând trei replici (și anume, n = 6). În cazul unor rezultate discordante între cele două repetiții, se efectuează o a treia repetare conținând trei replici (și anume, n = 9). Fiecare repetiție independentă se efectuează în altă zi, cu soluții mamă proaspete de substanțe chimice de testat și celule recoltate în mod independent. Cu toate acestea, celulele pot să provină din același pasaj.

În urma însămânțării, astfel cum este descris la punctul 20, se cultivă celulele timp de 24 de ore în plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri. Mediul este apoi îndepărtat și înlocuit cu un mediu de cultură proaspăt (150 μl mediu de cultură fără ser, conținând geneticină în cazul KeratinoSens™), la care se adaugă 50 μl de substanță chimică de testat și substanțe martor diluate de 25 ori. Cel puțin un godeu la fiecare placă de mictotitrare se lasă gol (fără celule și fără tratament) pentru a evalua valori de bază.

Se incubează ulterior placile tratate timp de aproximativ 48 de ore la o temperatură de 37 ± 1 °Cîn prezența a 5 % CO_2 în testul KeratinoSens™. Se acordă atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat prin, de exemplu, acoperirea plăcilor cu o folie înainte de incubația cu substanțele chimice de testat.

Măsurători de activitate ale luciferazei

Trei factori sunt esențiali pentru a asigura citiri adecvate ale luminiscenței:

— alegerea unui luminometru sensibil,

— utilizarea unui format de placă de mictotitrare cu o înălțime suficientă pentru a evita contaminarea încrucișată cu lumina și

— utilizarea unui substrat de luciferază cu putere suficientă de lumină pentru a asigura un nivel suficient de sensibilitate și o variabilitate scăzută.

Înainte de testare, se efectuează un experiment de control, astfel cum este descris în apendicele 3, astfel încât să se asigure îndeplinirea acestor trei puncte.

După expunerea timp de 48 de ore la substanța chimică de testat și substanțele martor în testul KeratinoSens™, se spală celulele cu o soluție salină tamponată cu fosfat și se adaugă tamponul de lizare pentru citirile luminiscenței în fiecare godeu timp de 20 minute la temperatura camerei.

▼M7

Se plasează ulterior plăcile cu lizatul de celule în luminometru pentru citire, care în testul KeratinoSens™ este programat: (i) să adauge substratul de luciferază la fiecare godeu (și anume, 50 µl), (ii) să aștepte timp de 1 secundă și (iii) să integreze activitatea luciferazei timp de 2 secunde. În cazul în care se utilizează setări alternative, de exemplu, în funcție de modelul de luminometru utilizat, acestea necesită justificare. În plus, un substrat de preîncălzire poate fi utilizat, de asemenea, cu condiția ca experimentul de control al calității dinapendicele3 să fie îndeplinit cu succes.

Evaluarea citotoxicității

În cazul testului ce viabilitate celulară KeratinoSens™, mediul se înlocuiește după expunerea timp de 48 de ore cu mediu proaspăt care conține MTT[bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazoliu, bromură de tiazolil albastru tetrazoliu; nr. CAS 298-93-1)] și se incubează celulele timp de 4 ore la 37 °C în prezența a 5 % CO_2. Se îndepărtează ulterior mediul cu MTT și se lizează celulele (de exemplu, prin adăugarea a 10 % soluție SDS la fiecare godeu) peste noapte. După agitare, se măsoară absorbția și anume, la 600 nm cu ajutorul unui fotometru.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

În cadrul testului KeratinoSens™ se calculează următorii parametrii:

— coeficientul de inducție medie maximă a valorii activității luciferazei (I_{max}) observat la orice concentrație de substanță chimică de testat și martor pozitiv;

— valoarea $CE_{1,5}$ care reprezintă concentrația la care inducția activității luciferazei este peste pragul de 1,5 de ori (și anume, activitatea luciferazei cu 50 % mai mare); și

— concentrațiile valorilor CI_{50} și CI_{30} pentru reducerea cu 50 % și 30 % a viabilității celulare.

— Coeficientul de inducție a activității luciferazei se calculează prin ecuația 1, iar coeficientul de inducție maximă generală (I_{max}) se calculează ca medie a repetițiilor individuale.

Ecuația 1:

$$\textit{Coeficientul de inducție} = \frac{(L_{probă} - L_{alb})}{(L_{solvent} - L_{alb})}$$

unde

$L_{probă}$ este valoarea citirii luminiscenței în godeul cu substanță chimică de testat

L_{gol} este valoarea citirii luminiscenței în godeul gol care nu conține nici celule, nici tratament

$L_{solvent}$ este media valorilor citirilor luminiscenței în godeurile care conțin celule și martorul solvent (negativ)

$CE_{1,5}$ se calculează prin interpolare liniară, conform ecuației 2 și $CE_{1,5}$ generală se calculează ca media geometrică a repetițiilor individuale.

Ecuația 2:

$$EC\mathbf{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

unde

C_a este concentrația minimă în µM cu inducție > 1,5 ori

C_b este concentrația maximă în µM cu inducție < 1,5 ori

I_a este coeficientul de inducție măsurat la concentrația minimă cu inducție > 1,5 ori (media a trei godeuri replici)

I_b este coeficientul de inducție la concentrația maximă cu inducție < 1,5 ori (media a trei godeuri replici)

Viabilitatea se calculează prin ecuația 3:

Ecuația 3:

$$Viabilitate = \frac{(V_{probă} - V_{alb})}{V_{solvent} - V_{alb}} \times 100$$

unde

$V_{probă}$ este valoarea citirii absornanței MTT în godeul care conține substanța chimică de testat

V_{gol} este valoarea citirii absornanței MTT în godeul gol care nu conține celule sau tratament

$V_{solvent}$ este media valorilor citirii absorbanței MTT în godeurile care conțin celule și martor solvent (negativ)

CI_{50} and CI_{30} se calculează prin interpolare liniară, conform ecuației 4 și CI_{50} and CI_{30} generale se calculează ca medie geometrică a repetițiilor individuale.

Ecuația 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

unde

X este % de reducere la concentrația care urmează să fie calculată (50 și 30 pentru CI_{50} and CI_{30})

C_a este concentrația minimă în µm cu > x % reducere în ceea ce privește viabilitatea

C_b este concentrația maximă în µm cu < x % reducere în ceea ce privește viabilitatea

V_a este % de viabilitate la concentrația minimă cu > x % reducere în ceea ce privește viabilitatea

V_b este % de viabilitate la concentrația maximă cu < x % reducere în ceea ce privește viabilitatea

Pentru fiecare concentrație care prezintă > 1,5 ori inducție a activității luciferazei, se calculează semnificația statistică [de exemplu, printr-un test t student cu două eșantioane], comparând valorile luminiscenței pentru cele trei probe replici cu valorile luminiscenței în godeurile care conțin martor solvent (negativ) pentru a determina dacă inducția activității luciferazei este semnificativă din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). Concentrația minimă cu > 1,5 ori inducție a activității luciferazei este valoarea care determină valoarea $CE_{1,5}$. Aceasta se verifică în fiecare caz indiferent dacă valoarea este inferioară valorii CI_{30}, indicând o reducere mai mică de 30 % a viabilității celulare la concentrația determinantă $CE_{1,5}$.

▼M7

Se recomandă verificarea vizuală a datelor cu ajutorul graficelor. În cazul în care nu se observă în mod clar o curbă doză-răspuns sau în cazul în care curba doză-răspuns obținută este bifazică (și anume, depășirea de două ori a pragului de 1,5) experimentul se repetă pentru a verifica dacă acestea sunt specifice substanței chimice de testat sau sunt cauzate de artefacte experimentale. În cazul în care răspunsul bifazic este reproductibil în cadrul unui experiment independent, se raportează cea mai scăzută valoare $CE_{1,5}$ (concentrația la prima depășire a pragului de 1,5).

În cazurile rare în care se observă o inducție nesemnificativă din punct de vedere statistic de peste 1,5 ori urmată de o concentrație mai mare cu o inducție semnificativă din punct de vedere statistic, rezultatele obținute din această repetare sunt considerate valabile și pozitive doar în cazul în care inducția semnificativă din punct de vedere static care depășește pragul de 1,5 a fost obținută pentru o concentrație necitotoxică.

În cele din urmă, în cazul substanțelor chimice de testat care deja generează o inducție de 1,5 de ori sau mai mare la concentrația minimă de testare de 0,98 μm, valoarea $CE_{1,5}$< 0,98 se stabilește pe baza inspecției vizuale a curbei doză-răspuns.

Criterii de acceptare

Criteriile de acceptare menționate în continuare trebuie îndeplinite la utilizarea testului KeratinoSens™. În primul rând, inducția activității luciferazei obținută cu martorul pozitiv, aldehida cinamică, trebuie să fie semnificativă din punct de vedere statistic peste pragul de 1,5 (de exemplu, utilizând un test t) în cel puțin una dintre concentrațiile testate (de la 4 la 64 μM).

În al doilea rând, valoarea $CE_{1,5}$ trebuie să se încadreze între două deviații standard ale valorii medii anterioare ale instalației de testare (de exemplu, între 7 μM și 30 μM pe baza setului de date de validare), care trebuie să fie actualizată în mod regulat. În plus, rata medie de inducție în cele trei replici pentru aldehida cinamică la 64 μM trebuie să fie între 2 și 8. În cazul în care ultimul criteriu nu este îndeplinit, se verifică cu atenție relația doză răspuns a aldehidei cinamice și testele pot fi acceptate numai în cazul în care există în mod clar o relație doză-răspuns cu inducție crescută a activității luciferazei la concentrații mărite a martorului pozitiv.

În cele din urmă, coeficientul mediu al variației citirilor de luminiscență pentru martorul negativ (solvent) DMSO trebuie să fie sub 20 % pentru fiecare repetare care constă în 6 godeuri testate în triplicat. În cazul în care variabilitatea este mai mare, rezultatele se elimină.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

O estimare KeratinoSens™ este considerat pozitivă în cazul în care următoarele 4 condiții sunt îndeplinite în 2 din 2 sau în aceleași 2 din 3 repetări; în caz contrar, estimarea KeratinoSens™ este considerată negativă (figura 1):

1. I_{max} este mai mare (>) de 1,5 ori și în mod semnificativ diferită din punct de vedere statistic în comparație cu martorul solvent (negativ) (astfel cum este determinată cu ajutorul unui test t Student cu două eșantioane, neîmperecheate);

2. viabilitatea celulară este mai mare (>) de 70 % la concentrația minimă cu inducția activității luciferazei de peste 1,5 de ori (și anume, la concentrația determinantă $CE_{1,5}$);

3. valoarea $CE_{1,5}$ este mai mică (<) de 1000 μM (sau < 200 μg/ml pentru substanțele chimice fără MW definită);

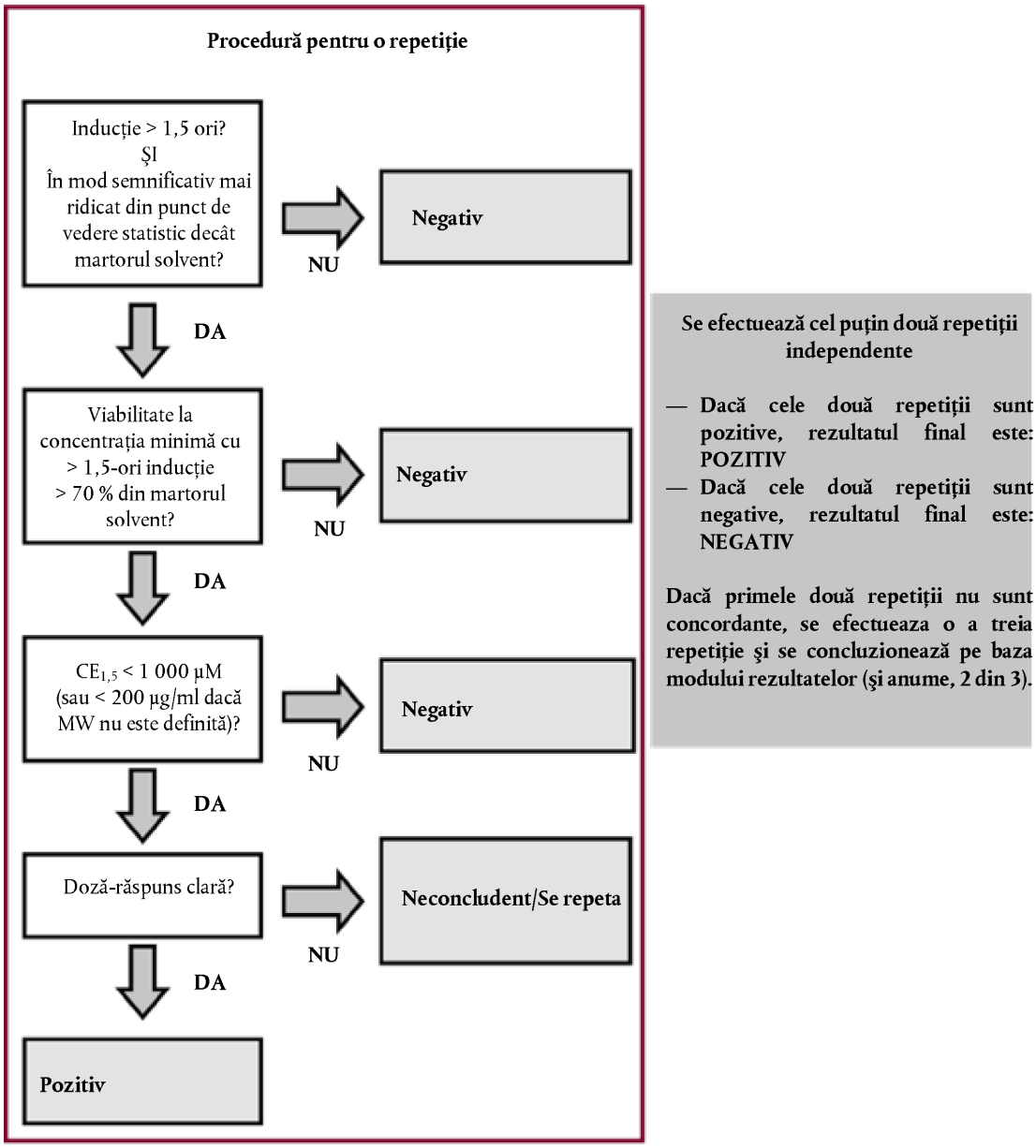
4. există o relație doză-răspuns generală aparentă pentru inducția de luciferază (sau un răspuns bifazic astfel cum se menționează la punctul 33).

▼M7

În cazul în care, în cadrul unei anumite repetări, toate primele trei condiții sunt îndeplinite, dar nu se observă o relație doză-răspuns clară pentru inducția de luciferază, rezultatul respectivei repetări se consideră neconcludent și pot fi necesare testări suplimentare (figura 1). În plus, un rezultat negativ obținut la concentrații < 1000 µM (sau < 200 µg/ml pentru substanțele chimice de testat fără MW definită) se consideră neconcludent (a se vedea punctul 11).

Figura 1

Modelul predictiv utilizat în cadrul testului KeratinoSens™. O estimare KeratinoSens™ se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11.



În cazuri rare, substanțele chimice de testat care induc activitatea luciferazei la un nivel foarte apropiat de nivelurile citotoxice pot fi pozitive în anumite repetări la niveluri necitotoxice [și anume, concentrație determinantă $CE_{1,5}$ sub nivelul (<) CI_{30}] și în alte repetări numai la niveluri de citotoxicitate [și anume, concentrație determinantă $CE_{1,5}$ mai mare (>) decât CI_{30}]. Astfel de substanțe chimice de

▼M7

testat se retestează cu o analiză a relației doză-răspuns mai limitată, utilizând un factor de diluție mai mic [de exemplu, 1,33 sau Ö2 (= 1,41) ori diluția dintre godeuri) pentru a determina dacă a avut loc sau nu inducție la niveluri citotoxice (9).

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

— substanță monocomponentă

  — Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil;

  — Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

  — Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

  — Concentrația (concentrațiile) testată(e);

  — Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil.

— substanță multicomponentă, UVCB și amestec:

  — Caracterizarea, în măsura în care este posibil, de exemplu identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, în măsura în care este posibil;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil;

  — Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

  — Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

  — Concentrația (concentrațiile) testată (testate);

  — Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil.

Martori

— Martor pozitiv

  — Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

  — Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil și dacă este cazul;

  — Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

  — Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

  — Concentrația (concentrațiile) testată(e);

  — Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil;

▼M7

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care să demonstreze criterii adecvate de acceptare a determinării, dacă este cazul.

— Martor negativ (vehicul)

— Identificare chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) CAS și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectul fizic, masa moleculară și proprietățile fizico-chimice relevante suplimentare în cazul în care se utilizează alți martori negativi/vehicule decât cei menționați în această metodă de testare și în măsura în care este posibil;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, în măsura în care este posibil;

— Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condițiile metodei de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— Descrierea metodei de testare utilizate;

— Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la care a fost obținută);

— Numărul de pasaje și nivelul de confluență a celulelor utilizate pentru testare;

— Metoda utilizată pentru numărarea celulelor pentru însămânțare înainte de testare și măsurile luate pentru a asigura distribuția omogenă a numărului de celule (cf. punctul 20);

— Luminometrul utilizat (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentului, substratul de luciferază utilizat, precum și demonstrarea măsurătorilor corespunzătoare de luminiscență pe baza testului de control descris la apendicele 3;

— Procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța reproductibilă a metodei de testare în timp.

Procedura de testare

— Numărul de repetări și replici utilizate;

— Concentrațiile substanței chimice de testat, procedura de aplicare și timpul de expunere utilizate (în cazul în care acestea diferă de cele recomandate)

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea în formă tabelară a valorilor I_{max}, $CE_{1,5}$ și ale viabilității (și anume, CI_{50}, CI_{30}) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv la fiecare repetare, precum și valorile medii (I_{max}: valoarea medie; valorile $CE_{1,5}$ și ale viabilității: valoarea medie geometrică) și DS calculate utilizând date din fiecare repetare individuală și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat conform modelului predictiv;

▼M7

— Coeficientul de variație obținut din citirile luminiscenței pentru martorul negativ pentru fiecare experiment;

— Un grafic care descrie curbele doză-răspuns ale inducției activității luciferazei și viabilității;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul testului KeratinoSens™;

— Luarea în considerare a rezultatelor metodei de testare în contextul unei IATA, în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzie

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibil la: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Partea 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici.

(5) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.

(6) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: DA.

(7) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare dermică: Testul local pe ganglioni limfatici: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 p. Disponibil la: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 p. Disponibil la: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 12201225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 22252232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 p. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼**M7**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (29).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): O serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul declanșator molecular până la un răspuns *in vivo* de interes (2).

ERA: Element de răspuns antioxidant (denumite, de asemenea EpRE, element de răspuns elecrofil) este un element de răspuns care se găsește în regiunea promotor amonte a multor gene citoprotective și fază II. Atunci când sunt activate de către Nrf2, acestea mediază inducția transcripțională a genelor respective.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Coeficient de variație: O măsură a variabilității care se calculează pentru un grup de date replici prin împărțirea deviației standard la valoarea medie. Aceasta poate fi multiplicată cu 100 pentru exprimarea ca procent.

$CE_{1,5}$: Concentrația interpolată pentru o inducție a luciferazei de 1,5 ori.

CI_{30}: Concentrație care are ca efect o reducere cu 30 % a viabilității celulare.

CI_{50}: Concentrație care are ca efect o reducere cu 50 % a viabilității celulare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

I_{max}: Factor maxim de inducție a activității luciferazei în comparație cu martorul solvent (negativ) măsurat la orice concentrație a substanței chimice de testat.

Keap 1: Proteina 1 kelch asociată cu epiclorhidrina este o proteină senzor care poate reglementa activitatea Nrf2. În condițiilor neinduse, proteina senzor keap 1 declanșează factorul de transcripție Nrf2 pentru ubicuitinarea și degradarea proteolitică în proteazom. Modificarea covalentă a reziduurilor reactive de cisteină ale keap 1 în molecule mici poate conduce la o disociere a nrf2 din keap 1 (8) (10) (11).

▼M7

Amestec: Un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe în care acestea nu reacționează (1).

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în măsură de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

Nrf2: Factor 2 nuclear rezultat din factorul eritroidului 2 este un factor de transcripție implicat în parcursul răspunsului antioxidant. Atunci când Nrf2 nu este ubicuitinat, acesta se dezvoltă în citoplasmă și se translocă în nucleu, unde se combină cu ERA în regiunea promotor amonte a mai multor gene citoprotective, inițind transcripția acestora (8) (10) (11).

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (29).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în timp, în același laborator sau în laboratoare diferite, utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (29).

Reproductibilitate: Acordul dintre rezultatele obținute în urma testării aceleiași substanțe chimice, utilizând același protocol de testare (a se vedea fiabilitatea) (29).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active care sunt clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (29).

Martor solvent/vehicul: O replică ce conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția substanței chimice de testat, dar incluzând solventul utilizat. Este utilizat pentru a stabili nivelul de bază al reacției pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (29).

Substanță: Elemente chimice și compușii lor în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia (1).

Substanță chimică de testat: Termenul „substanță chimică de testat” se utilizează pentru a face referință la ceea ce este testat.

▼M7

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

Metoda de testare valabilă: O metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. O metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (29).

▼M7

Apendicele 2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Sensibilizare cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin obținerea în mod corect a estimării KeratinoSens™ pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru $CE_{1,5}$ și CI_{50} care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială, disponibilitatea referințelor *in vivo* de calitate superioară și disponibilitatea datelor *in vitro* de calitate superioară din testul KeratinoSens™.

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice cu testul KeratinoSens™

Substanțe de verificare	Nr. CAS	Forma fizică	Estimare *in vivo* (1)	Estimare KeratinoSens™ (2)	Interval de referință $CE_{1,5}$ (μM) (3)	Interval de referință CI_{50} (μM) (3)
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Acid salicilic	69-72-7	Solid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Lichid	Nesensibilizant	Negativ	> 1 000	> 1 000
Alcool cinamilic	104-54-1	Solid	Sensibilizant (redus)	Pozitiv	25 – 175	> 1 000
Etilenglicol dimetacrilat	97-90-5	Lichid	Sensibilizant (redus)	Pozitiv	5 – 125	> 500
2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Sensibilizant (moderat)	Pozitiv	25 – 250	> 500
Metildibromo-glutaro-nitril	35691-65-7	Solid	Sensibilizant (puternic)	Pozitiv	< 20	20 – 100
4-metilaminofenol sulfat	55-55-0	Solid	Sensibilizant (puternic)	Pozitiv	< 12,5	20 – 200
2,4- dinitro-clorobenzen	97-00-7	Solid	Sensibilizant (extrem)	Pozitiv	< 12,5	5 – 20

(1) Estimările pericolului *in vivo* (și potenței) se bazează pe date LLNA (13). Potența *in vivo* se calculează pe baza criteriilor propuse de ECETOC (24).
(2) O estimare KeratinoSens™ se ia în considerare în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctele 9 și 11 din prezenta metodă de testare.
(3) Pe baza valorilor anterioare observate (12).

▼M7

Apendicele 3

CONTROLUL CALITĂȚII PENTRU MĂSURĂTORILE LUMINESCENȚEI

Experiment de bază pentru asigurarea unor măsurători optime ale luminiscenței în testul KeratinoSens™

Următorii trei parametri sunt esențiali pentru a asigura obținerea unor rezultate fiabile cu ajutorul luminometrului:

— existența unui grad suficient de sensibilitate cu un mediu stabil în godeurile martor;

— inexistența unui gradient pentru placa de microtitrare din cauza duratelor lungi de citire; și

— necontaminarea cu lumină în godeurile adiacente din godeurile foarte active.

Înainte de testare, se recomandă asigurarea de măsurători corespunzătoare ale luminescenței prin testarea unei plăci de microtitrare martor configurată astfel cum se descrie mai jos (analiză în triplicat).

Configurația plăcii de microtitrare a primului experiment de pregătire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**AC 4**	**AC 8**	**AC 16**	**AC 32**	**AC 64**	**Blanc**

EGDMA = Etilenglicol dimetacrilat (Nr. CAS: 97-90-5) o substanță chimică cu inducție puternică

AC = aldehidă cinamică, referință pozitivă (Nr. CAS: 104-55-2)

Analiza de control al calității trebuie să demonstreze:

— o relație doză-răspuns clară în rândul D, cu I_{max}> 20 ori peste nivelul de bază (în majoritatea cazurilor se ating valori I_{max} cuprinse între 100 și 300);

— nicio relație doză-răspuns în rândul C și E [nicio valoare de inducție peste 1,5 (în mod ideal, mai mică sau egală cu 1,3)] din cauza unei eventuale contaminări cu lumină, în special lângă godeurile foarte active în rândul EGDMA;

— nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic între rândurile A, B, C, E, F și G (și anume, fără gradient pentru placa de microtitrare); și

— variabilitate în oricare dintre rândurile A, B, C, E, F și G și godeurile cu DMSO în rândul H trebuie să fie sub 20 % (și anume, nivel de bază stabil).

▼M7

B.61. METODA DE TESTARE A SCURGERII DE FLUORESCEINĂ PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR AVÂND UN CARACTER COROZIV ȘI UN POTENȚIAL IRITANT SEVER LA NIVEL OCULAR

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 460 (2012). Metoda de testare a scurgerii de fluoresceină (Fluorescein Leakage – FL) este o metodă de testare *in vitro* care poate fi utilizată, în anumite circumstanțe și cu anumite limite, pentru clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) drept substanțe având un caracter coroziv și un potențial iritant sever, astfel cum sunt definite de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (categoria 1), de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]) (categoria 1) și de Agenția de protecție a mediului din SUA (EPA) (categoria I) (1) (2). În scopul acestei metode de testare, substanțele cu potențial iritant ocular sever sunt definite drept substanțe chimice care provoacă lezarea tisulară la nivel ocular, în urma administrării substanței chimice de testat, care nu este reversibilă după 21 de zile sau care provoacă o deteriorare fizică gravă a vederii, în timp ce substanțele având un caracter coroziv sunt substanțe chimice care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivel ocular. Aceste substanțe chimice sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU, categoria 1 din Regulamentul CLP al UE și categoria 1 EPA SUA.

În timp ce metoda de testare FL nu este considerată adecvată pentru a substitui în întregime testul *in vivo* pe ochi de iepure, FL este recomandată pentru a fi inclusă într-o strategie de testare secvențială pentru clasificarea și etichetarea reglementară. Prin urmare, FL este recomandată ca un prim pas în cadrul unei abordări descendente pentru a identifica substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever, în mod specific pentru tipuri limitate de substanțe chimice (și anume, substanțe solubile în apă și amestecuri) (3) (4).

În prezent, este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test *in vitro* de iritație oculară nu va fi în măsură să substituie testul ocular *in vivo* [MT B.5 (5)] pentru a efectua estimări în cadrul întregii plaje de valori de iritație pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unei strategii de testare (secvențiale) pot fi în măsură să substituie testul ocular *in vivo* (4). Abordarea descendentă (4) este proiectată pentru a fi utilizată în cazul în care, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică are un potențial iritant sever.

Pe baza modelului predictiv detaliat la punctul 35, metoda de testare FL poate identifica substanțe chimice, în cadrul unui domeniu limitat de aplicabilitate, ca substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular (categoria 1 din GHS al ONU; categoria din Regulamentul CLP al UE; categoria 1 EPA SUA) fără testare suplimentară. Același lucru este valabil pentru amestecuri, cu toate că în cadrul studiului de validare nu au fost utilizate amestecuri. Prin urmare, metoda de testare FL poate fi utilizată pentru a determina riscul coroziv/iritant la nivel ocular al substanțelor chimice conform strategiei de testare secvențială a MT B.5 (5). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu este estimată ca având potențial coroziv sau iritant sever la nivel ocular prin metoda de testare FL necesită testare prin una sau mai multe metode de testare suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) capabile să identifice cu precizie i) substanțele chimice care în FL au caracter coroziv/potențial iritant sever *in vitro* fals negativ (categoria 1 din GHS al ONU); categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; categoria I EPA SUA); ii) substanțele chimice care nu sunt clasificate pentru coroziunea/iritația oculară (nicio categorie din GHS al

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353, 31.12.2008, p. 1.

▼M7

ONU; nicio categorie din Regulamentul CLP al UE; categoria IV EPA SUA); și iii) substanțele chimice care sunt iritanți oculari moderați/ușori (categoriile 2A și 2B din GHS al ONU; categoria 2 din Regulamentul CLP al UE: categoriile II și III EPA SUA).

Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul coroziv sau iritant sever la nivel ocular al unei substanțe chimice de testat, măsurat prin capacitatea acesteia de a induce leziuni unui monostrat epitelial impermeabil confluent. Integritatea permeabilității transepiteliale este o funcție majoră a unui epiteliu, asemănătoare celei întâlnite la conjunctivă și la cornee. Permeabilitatea transepitelială este controlată de diverse joncțiuni strânse. Creșterea permeabilității epiteliului cornean *in vivo* s-a dovedit a fi corelată cu nivelul de inflamație și leziuni de suprafață constatate pe măsură ce iritația oculară se dezvoltă.

În metoda de testare FL, efectele toxice după o expunere scurtă la substanța chimică de testat sunt măsurate printr-o creștere a permeabilității fluoresceinei sodice prin monostratul epitelial al celulelor renale Madin-Darby de câine (MDCK) cultivate pe inserții permeabile. Cantitatea de scurgere de fluoresceină care apare este proporțională cu leziunea provocată de substanța chimică joncțiunilor strânse, joncțiunilor desmozomice și membranelor celulare și poate fi utilizată pentru estimarea potențialului toxicității oculare al unei substanțe chimice de testat. În apendicele 1 prezintă o diagramă a celulelor MDCK cultivate pe o inserție cu membrană pentru metoda de testare FL.

Definițiile sunt prevăzute în apendicele 2.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Această metodă de testare are la bază protocolul nr. 71 al INVITTOX (6), care a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare internațional de către Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM), în colaborare cu Comitetul de Coordonare Interagenții cu privire la validarea metodelor alternative (ICCVAM) al SUA și cu Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM).

Metoda de testare FL nu se recomandă pentru identificarea substanțelor chimice care sunt clasificate ca iritanți ușori/moderați sau a substanțelor chimice care nu sunt clasificate pentru iritație oculară (substanțe și amestecuri) (și anume, cat. 2A/2B, nicio cat. din GHS.; cat. 2, nicio cat. din Regulamentul CLP al UE; cat. II/III/IV EPA SUA), astfel cum a fost demonstrat de studiul de validare (3) (7).

Metoda se aplică numai pentru substanțele chimice solubile în apă (substanțe și amestecuri). Potențialul de iritație oculară severă al substanțelor chimice solubile în apă și/sau în cazul în care efectele toxice nu sunt afectate de diluție este estimat, în general, cu precizie utilizând metoda de testare FL (7). Pentru clasificarea unei substanțe chimice ca fiind solubilă în apă, în condiții experimentale, aceasta trebuie să fie solubilă în soluție salină echilibrată Hanks (HBSS), sterilă, care conține calciu (cu o concentrație de 1,01,8 mM), fără roșu fenol la o concentrație $\geq$ 250 µg/ml (o doză peste limita de 100 mg/ml). Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică de testat este solubilă la o concentrație sub 100 mg/ml, dar deja determină o inducție FL de 20 % la concentrația respectivă (însemnând FL_{20} < 100 mg/ml100 mg/ml), acesta poate fi clasificată, cu toate acestea, în cat. 1 din GHS. sau cat. I EPA.

Limitele identificate pentru această metodă de testare exclud acizii și bazele puternice, fixatorii de celule și substanțele chimice puternic volatile din domeniul de aplicabilitate. Aceste substanțe chimice au mecanisme care nu sunt măsurate prin metoda de testare FL, de exemplu coagulare extensivă, saponificare sau anumite compoziții chimice reactive. Alte limite identificate pentru această metodă se bazează pe rezultatele pentru capacitatea de estimare pentru substanțe chimice de testat colorate și vâscoase (7). Se sugerează faptul că ambele tipuri de substanțe chimice sunt dificil de îndepărtat din monostrat după perioada de expunere pe termen scurt și că predictibilitatea metodei de

▼M7

testare ar putea fi îmbunătățită în cazul în care se utilizează un număr mai mare de spălări. Substanțele chimice solide în suspensie în lichid au tendința de a precipita, iar concentrația finală la celule poate fi dificil de determinat. Atunci când substanțele din aceste clase chimice și fizice sunt eliminate din baza de date, precizia FL în ceea ce privește sistemele de clasificare UE, EPA și GHS este îmbunătățită substanțial (7).

Pe baza scopului acestei metode de testare (și anume, identificarea numai a substanțelor cu caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), ratele de rezultate fals negative (a se vedea punctul 13) nu sunt esențiale având în vedere faptul că astfel de substanțe chimice ar fi testate ulterior cu alte teste *in vitro* validate în mod corespunzător sau pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare, utilizând o strategie de testare secvențială cu o abordare având la bază forța probantă a datelor (5) (a se vedea, de asemenea, punctele 3 și 4).

Alte limite identificate ale metodei de testare FL se bazează pe rate de rezultate fals negative și fals pozitive. Atunci când este utilizată ca o etapă inițială în cadrul unei abordări descendente pentru a identifica substanțe și amestecuri solubile în apă având un caracter coroziv/iritant sever la nivel ocular (categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; categoria I EPA a SUA) rata de rezultate fals pozitive pentru metoda de testare FL s-a încadrat în plaja de valori de la 7 % (7/103; GHS al ONU și Regulamentul CLP al UE) până la 9 % (9/99; EPA a SUA) și rata de rezultate fals negative s-a încadrat în plaja de valori de la 54 % (15/28; EPA a SUA) până la 56 % (27/48) în comparație cu rezultatele *in vivo*. Grupele chimice care prezintă rezultate fals pozitive și/sau fals negative în metoda de testare FL nu sunt definite în prezentul document.

Anumite limitări tehnice sunt specifice culturii de celule MDCK. Joncțiunile strânse care împiedică trecerea colorantului fluoresceină sodică prin monostrat sunt din ce în ce mai mult compromise de creșterea numărului de pasaje celulare. Formarea incompletă de joncțiuni strânse conduce la creșterea FL în martorul netratat. Prin urmare, o scurgere definită maximă admisă în martorii netratați este importantă (a se vedea punctul 38: scurgere 0 %). La fel ca în cazul tuturor testelor *in vitro*, celulele au potențialul de a se transforma de-a lungul timpului, astfel încât este esențial să se declare intervalele numărului de pasaje pentru teste.

Actualul domeniu de aplicabilitate poate fi mărit în unele cazuri, dar numai după analizarea unui set extins de date din studii pe substanțe chimice de testat, de preferință dobândită prin testare (3). Această metodă de testare va fi actualizată în consecință, pe măsură ce noi informații și date sunt luate în considerare.

Toate laboratoarele care utilizează pentru prima dată această testare trebuie să utilizeze substanțele de verificare menționate în apendicele 3. Laboratoarele pot utiliza respectivele substanțe chimice pentru a demonstra competența tehnică proprie în ceea ce privește efectuarea metodei de testare FL înainte de trimiterea datelor testului FL în scopul clasificării reglementare a pericolelor.

PRINCIPIUL TESTULUI

FL este un test *in vitro* bazat pe citotoxicitate și funcționarea celulei, care se efectuează pe un monostrat confluent de celule MDCK CB997 tubulare epiteliale care sunt cultivate pe inserții semipermeabile și modelează starea neproliferară a epiteliului cornean *in vivo*. Linia celulară MDCK este bine stabilită și formează joncțiuni strânse și joncțiuni desmozomice similare celor întâlnite pe latura apicală a epiteliilor conjunctivale și corneene. Joncțiunile strânse și cele desmozomice *in vivo* previn pătrunderea soluților și a materiilor străine la nivelul epiteliului cornean. Pierderea de impermeabilitate transepitelială, datorită joncțiunilor strânse și joncțiunilor desmozomice deteriorate, este unul dintre primele evenimente ale iritației oculare provocate de substanța chimică.

▼M7

Substanța chimică de testat se aplică stratului confluent de celule cultivate pe latura apicală a inserției. În mod curent se utilizează o expunere scurtă, de 1 minut, pentru a reflecta rata normală de eliminare la expunerea umană. Un avantaj al expunerii scurte constă în faptul că substanțele și amestecurile pe bază de apă pot fi testate în stare pură, în cazul în care acestea pot fi ușor eliminate după perioada de expunere. Acest lucru permite mai multe comparații directe între rezultate și efectele chimice la oameni. Substanța chimică de testat este ulterior îndepărtată și colorantul fluoresceină sodică netoxic, cu nivel ridicat de fluorescență se adaugă laturei apicale a monostratului timp de 30 de minute. Se determină leziunea provocată de substanța chimică de testat joncțiunilor strânse prin cantitatea de fluoresceină care se scurge prin stratul celular într-o perioadă de timp definită.

Se determină cantitatea de colorant fluoresceină sodică care trece prin monostrat și prin membrana de inserție într-un volum predeterminat de soluție prezentă în godeu (în care se scurge colorantul fluoresceină sodică) prin măsurarea spectrofluorometrică a concentrației de fluoresceină din godeu. Se calculează cantitatea de scurgere de fluoresceină (FL) în funcție de citirile intensității de fluoresceină (FI) din doi martori: un martor alb și un martor pentru scurgerea maximă. Se exprimă procentul de scurgere și, prin urmare, volumul leziunilor la nivelul joncțiunilor strânse, raportat la martorii respectivi, pentru fiecare serie de concentrații de substanță chimică de testat. Ulterior, se calculează FL_{20} (și anume, concentrația care provoacă 20 % FL față de valoarea înregistrată pentru monostratul confluent netratat și pentru inserțiile fără celule). Valoarea FL_{20} (mg/ml) se utilizează în modelul predictiv pentru identificarea substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular (a se vedea punctul 35).

Recuperarea este o parte importantă a profilului de toxicitate al substanței chimice de testat și este evaluată, de asemenea, prin testul *in vivo* de iritație oculară. Analizele preliminare au indicat faptul că datele de recuperare (până la 72 de ore în urma expunerii chimice) ar putea spori capacitatea de estimare din Protocolul 71 al INVITTOX, dar este necesară evaluarea suplimentară și ar beneficia de date suplimentare, obținute, de preferință, prin teste suplimentare (6). Această metodă de testare va fi actualizată în consecință, pe măsură ce noi informații și date sunt luate în considerare.

PROCEDURĂ

Pregătirea monostratului celular

Se pregătește monostratul de celule MDCK CB 997 utilizând celule subconfluente care cresc în flacoane de culturi celulare în DMEM/ amestec de nutrienți F12 [1x concentrat cu L-glutamină, 15 mM HEPES, calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM) și 10 % FCS/FBS inactivate la căldură)]. Este important ca toate mediile/soluțiile utilizate în testul FL să conțină calciu cu o concentrație între 1,8 mM (200 mg/l) și 1,0 mM (111 mg/l) pentru a asigura formarea și integritatea joncțiunilor strânse. Se controlează plaja de valori a numărului de pasaje celulare pentru a se asigura formarea de joncțiuni strânse egale și reproductibile. De preferință, celulele trebuie să se încadreze în intervalul de pasaje 3-30 de la decongelare, deoarece celulele care se încadrează în acest interval de pasaje au funcționalitate similară, ceea ce contribuie la obținerea de rezultate reproductibile ale testului.

Înainte de efectuarea metodei de testare FL, celulele se detașează din flacon prin tripsinizare, se centrifughează și o cantitate adecvată de celule se însămânțează în inserțiile plasate în plăci cu 24 de godeuri (a se vedea apendicele 1). Pentru însămânțarea celulelor se utilizează inserții cu diametrul de doisprezece mm cu membrană din amestec de esteri de celuloză, o grosime de 80-150 μm și o dimensiune a porilor de 0,45 μm. În studiul de validare au fost utilizate inserții de 12 mm Milicell-HA. Proprietățile inserției și tipul membranei sunt importante, întrucât acestea pot afecta cultivarea celulelor și legătura chimică. Anumite tipuri de substanțe chimice s-ar putea lega de inserția cu membrană Millicell-HA, fapt care ar putea afecta interpretarea rezultatelor. Substanțele chimice de verificare (a se vedea apendicele 3) se utilizează pentru a demonstra echivalența în cazul în care se utilizează alte membrane.

▼M7

Legătura chimică de inserția cu membrană este mult mai frecventă în cazul substanțelor chimice cationice precum clorura de benzalconiu, care sunt atrase de membrana încărcată (7). Legătura chimică cu inserția cu membrană poate crește perioada de expunere chimică, conducând la o supraestimare a potențialului toxic al substanței chimice, dar, de asemenea, poate reduce în mod fizic scurgerea de fluoresceină prin inserție, prin legarea colorantului de substanța chimică cationică legată de inserția cu membrană, conducând la o subestimare a potențialului toxic al substanței chimice. Acest lucru poate fi ușor monitorizat prin expunerea membranei singure la concentrația maximă de substanță chimică de testat și ulterior adăugarea colorantului fluoresceină sodică la concentrația normală pentru o perioadă de timp standard (fără martor celular). În cazul în care are loc legătura colorantului fluoresceină sodică, membrana inserției devine galbenă după ce materialul de testat a fost spălat. Prin urmare, este esențial să se cunoască proprietățile de legătură ale substanței chimice de testat pentru a putea interpreta efectul substanței chimice asupra celulelor.

Însămânțarea celulelor pe inserții produce un monostrat confluent la momentul expunerii chimice. Se adaugă 1,6 x 10^5 celule la fiecare inserție (400 µl dintr-o suspensie celulară cu o densitate de 4 x 10^5 celule/ml). În aceste condiții, un monostrat confluent se obține de regulă după 96 de ore în cultură. Se examinează vizual inserțiile înainte de însămânțare, astfel încât să se asigure că orice leziune înregistrată la controlul vizual descris la punctul 30 se datorează manipulării.

Se păstrează în incubatoare culturile celulare MDCK, într-o atmosferă umedă, la 5 % ± 1 %CO_2 și o temperatură de 37 ± 1 °C. Celulele nu trebuie să fie contaminate cu bacterii, virusuri, micoplasmă sau ciuperci.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a celor martor

Pentru fiecare determinare experimentală se pregătește o soluție mamă proaspătă de substanță chimică de testat și se utilizează în termen de 30 de minute de la prepararea acesteia. Se pregătesc substanțele chimice de testat în HBSS care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol pentru a evita legarea proteinelor serice. Se evaluează solubilitatea substanței chimice la 250 mg/ml în HBSS înainte de testare. În cazul în care, la această concentrație, substanța chimică formează o suspensie sau o emulsie stabilă (și anume, se menține în mod uniform și nu se decantează sau se separă în mai mult de o fază) timp de 30 minute, HBSS poate fi utilizată în continuare ca solvent. Cu toate acestea, în cazul în care substanța chimică este insolubilă în HBSS la această concentrație, se ia în considerare utilizarea altor metode de testare în loc de FL. Utilizarea uleiului mineral ușor ca solvent în cazurile în care substanța chimică se dovedește a fi insolubilă în HBSS se ia în considerare cu prudență, având în vedere faptul că nu există suficiente date disponibile pentru a extrage concluzii cu privire la performanța testului FL în astfel de condiții.

Toate substanțele chimice se pregătesc în HBSS sterilă, care conține calciu (cu o concentrație de 1,0- 1,8 mM), fără roșu fenol din soluția mamă, la cinci concentrații fixe diluate în greutate pe volum: 1, 25, 100, 250 mg/ml și o soluție pură sau saturată. Atunci când se testează o substanță chimică solidă, se include o concentrație foarte ridicată de 750 mg/ml. Această concentrație a substanței chimice ar putea necesita aplicarea pe celulele utilizând o pipetă cu deplasare. În cazul în care toxicitatea se situează între 25 și 100 mg/ml, se testează de două ori următoarele concentrații suplimentare: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Se obține valoarea FL_{20} din concentrațiile respective cu condiția îndeplinirii criteriilor de acceptare.

Se aplică substanțele chimice de testat la monostraturile celulare confluente după îndepărtarea mediului de cultură celulară și spălarea de două ori cu HBSS sterilă, caldă (37 °C), care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. Până în prezent, filtrele au fost verificate vizual pentru orice leziune pre-existentă care ar putea fi atribuită în mod fals potențialelor incompatibilități cu substanțele chimice de testat. Se utilizează cel puțin trei replici pentru fiecare

▼M7

concentrație de substanță chimică de testat și pentru martori la fiecare determinare. După expunerea de 1 minut la temperatura camerei, se îndepărtează cu grijă substanța chimică de testat prin aspirație, se spală de două ori monostratul cu HBSS sterilă, caldă (37 °C), care conține calciu (cu o concentrație de 1,01,8 MM), fără roșu fenol și se măsoară imediat scurgerea de fluoresceină.

La fiecare determinare se utilizează martori negativi (MN) și martori pozitivi (MP) testați în paralel pentru a demonstra faptul că integritatea monostratului (MN) și sensibilitatea celulelor (MP) se încadrează într-o plajă definită de valori de acceptare din teste anterioare. Substanța chimică MP recomandată este Brij 35 (Nr. CAS 9002-92-0) la 100 mg/ml. Această concentrație furnizează aproximativ 30 % scurgere de fluoresceină (plajă de valori acceptabile 20-40 % scurgere de fluoresceină, și anume, leziuni la nivelul stratului celular). Substanța chimică MN recomandată este HBSS (netratată, martor alb), care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. La fiecare determinare se include, de asemenea, un martor pentru scurgerea maximă pentru a permite calcularea valorilor FL_{20}. Scurgerea maximă se determină utilizând o inserție martor, fără celule.

Determinarea permeabilității fluoresceinei

Imediat după îndepărtarea substanțelor chimice de testat și martor, se adaugă în inserții (de exemplu, Millicell-HA) 400 µl de 0,1 mg/ml soluție fluoresceină sodică [0,01 % (g/v)] în HBSS care conține calciu (cu o concentrație de 1,0-1,8 mM), fără roșu fenol. Culturile se mențin la temperatura camerei timp de 30 minute. La sfârșitul perioadei de incubare cu fluoresceină, se îndepărtează cu atenție inserțiile din fiecare godeu. Se efectuează controlul vizual pentru fiecare filtru și se înregistrează orice leziune care ar putea să fi avut loc în timpul manipulării.

Se cuantifică cantitatea de fluoresceină care s-a scurs prin monostrat și prin inserție în soluția rămasă în godeuri după îndepărtarea inserțiilor. Se efectuează măsurători cu un spectrofluorimetru la lungimi de undă cu excitație și emisie de 485 nm și respectiv, 530 nm. Se fixează sensibilitatea spectrofluorimetrului astfel încât să existe cea mai mare diferență numerică între nivelul maxim de FL (inserție fără celule) și nivelul minim de FL (inserție cu monostrat confluent tratat cu MN). Din cauza diferențelor în ceea ce privește spectrofluorimetrul utilizat, se sugerează utilizarea unei sensibilități care să furnizeze un nivel de intensitate al fluorescenței > 4000 la martorul cu nivel maxim de scurgere. Valoarea maximă FL nu trebuie să depășească 9999. Intensitatea scurgerii maxime de fluorescență trebuie să se încadreze în plaja de valori lineară a spectrofluorimetrului utilizat.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

Cantitatea de FL este proporțională cu leziunile provocate de substanța chimică la nivelul joncțiunilor strânse. Se calculează procentul de FL pentru fiecare concentrație testată de substanță chimică din valorilor FL obținute pentru substanța chimică de testat cu referire la valori FL din MN (citire din monostratul confluent de celule tratate cu MN) și un martor cu nivel maxim de scurgere (citire pentru cantitatea de FL printr-o inserție fără celule).

Intensitatea medie a scurgerii maxime de fluorescență = x

Intensitatea medie pentru 0 % scurgere de fluorescență (MN)= y

Se obține valoarea medie pentru 100 % scurgere scăzând valoarea medie pentru 0 % scurgere din valoarea medie maximă de scurgere,

și anume, x – y = z

Se obține procentul de scurgere pentru fiecare doză fixă prin scăderea scurgerii de 0 % din intensitatea medie de fluorescență a celor trei citiri replici (m) și împărțind această valoare la scurgerea de 100 % și anume, %FL = [(m-y)/ z] x 100 %, unde:

▼M7

m = intensitatea medie de fluorescență a celor trei măsurători ale replicilor pentru concentrația implicată

%FL = procentul de fluoresceină care se scurge prin stratul celular

Se aplică următoarea ecuație pentru calcularea concentrației substanței chimice care provoacă 20 % FL:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Unde:

D = % de inhibare

A = % de lezare (20 % scurgere de fluoresceină)

B = % de scurgere de fluoresceină < A

C = % de scurgere de fluoresceină > A

M_C = Concentrația C (mg/ml)

M_B = Concentrația B (mg/ml)

Valoarea limită a FL_{20} pentru estimarea substanțelor chimice ca substanțe având un caracter coroziv/potențial iritant sever este prezentată mai jos:

FL_{20} (mg/ml)	GHS al ONU C&E	Regulamentul CLP al UE C&E	EPA SUA C&E
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

C&E: clasificare și etichetare

Metoda de testare FL se recomandă doar pentru identificarea substanțelor având un caracter coroziv și un potențial iritant sever la nivel ocular solubile în apă (categoria 1 din GHS al ONU, categoria 1 din Regulamentul CLP al UE, categoria I EPA SUA) (a se vedea punctele 1 și 10).

Pentru a identifica substanțele chimice (substanțe si amestecuri) solubile în apă (3) (6) (7) ca „provocând lezarea oculară gravă" (categoria 1 din GHS al ONU/ Regulamentul CLP al UE) sau ca „substanțe cu caracter coroziv sau potențial iritant sever la nivel ocular" (categoria I EPA SUA), substanța chimică de testat trebuie să inducă o valoare $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

Acceptarea rezultatelor

Valoarea medie maximă a scurgerii de fluoresceină (x) trebuie să fie mai mare de 4000 (a se vedea punctul 31), media scurgerii de 0 % (y) trebuie să fie mai mică sau egală cu 300, iar media scurgerii de100 % (z) trebuie să se situeze între 3700 și 6000.

Un test este considerat acceptabil în cazul în care martorul pozitiv produce leziuni la nivelul stratului celular de la 20 % la 40 % (măsurate în % de scurgere de fluoresceină).

DATE ȘI RAPORTARE

Date

Pentru fiecare determinare se înregistrează, sub formă de tabel, datele obținute pentru fiecare godeu replică (de exemplu, valorile intensității fluorescenței și date cu privire la procentele calculate de FL pentru fiecare substanță chimică de testat, inclusiv clasificarea). În plus, se înregistrează valorile medii ± DS ale fiecărei măsurători replică la fiecare determinare.

▼M7

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și martor

— Denumire (denumiri) chimică(e), precum denumirea structurală utilizată de Chemical Abstracts Service (CAS), urmată de alte denumiri, dacă se cunosc;

— Numărul CAS al substanței chimice, dacă se cunoaște;

— Puritatea și compoziția substanței sau a amestecului [în procent(e) pe greutate], în măsura în care această informație este disponibilă;

— Proprietățile fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului (de exemplu, starea fizică, volatilitatea, pH-ul, stabilitatea, solubilitatea în apă, clasă chimică);

— Tratamentul la care a fost supusă substanța chimică de testat/martor înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Condiții de depozitare;

Justificarea metodei de testare și a protocolului utilizat

— Trebuie să includă considerații cu privire la domeniul de aplicabilitate și limitările metodei de testare;

Condiții de testare

— Descrierea sistemului celular utilizat, inclusiv certificatul de autenticitate și statusul micoplasmei liniei celulare;

— Detalii privind procedura de testare utilizată;

— Concentrația (concentrațiile) de substanță chimică de testat utilizată(e);

— Durata expunerii la substanța chimică de testat;

— Durata de incubație cu fluoresceină;

— Descrierea oricăror modificări la procedura de testare;

— Descrierea criteriilor de evaluare utilizate;

— Trimiteri la date anterioare ale modelului (de exemplu, martori negativi și pozitivi, substanțe de referință, dacă este cazul);

— Informații cu privire la performanțele tehnice demonstrate de laborator;

Rezultate

— Prezentarea în formă tabelară a datelor cu privire la substanțele chimice de testat și martor individuale pentru fiecare determinare și fiecare măsurătoare a unei replici (inclusiv rezultate individuale, valori medii și DS);

— Clasificarea (clasificările) derivată(e), cu trimitere la modelul predictiv și/sau criteriile de decizie utilizate;

— Descrierea altor efecte observate;

▼**M7**

Discutarea rezultatelor

— Trebui să includă considerații cu privire la un rezultat neconcludent (punctul 35: FL_{20}> 100 mg/ml) și testarea suplimentară.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibil la: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Capitolul B.5 din prezenta anexă, *Toxicitate acută: iritație/ coroziune oculară*

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Disponibil la: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

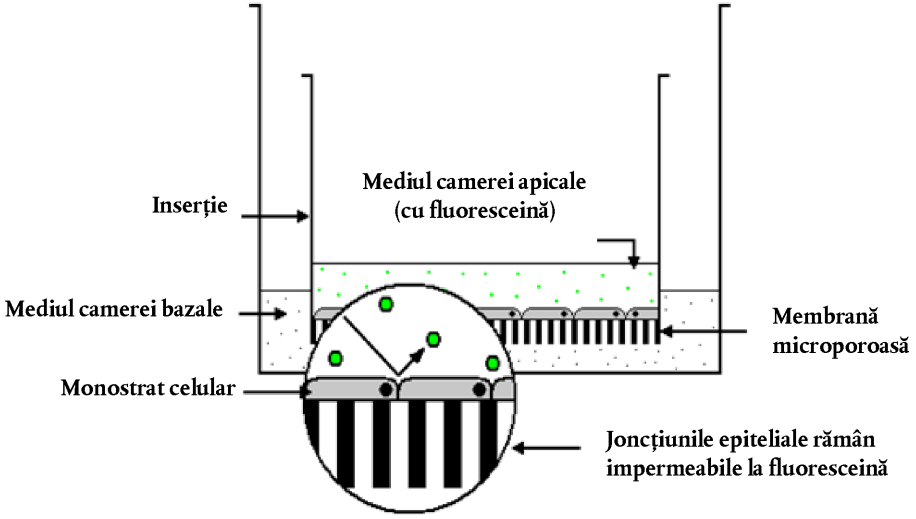
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Apendicele 1

DIAGRAMA CELULELOR MDCK CULTIVATE PE O INSERȚIE CU MEMBRANĂ PENTRU METODA DE TESTARE FL

Se cultivă un strat confluent de celule MDCK pe membrana semipermeabilă a unei inserții. Se introduc inserțiile în godeurile plăcilor de microtitrare cu 24 de godeuri.



Figură preluată din: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Apendicele 2

DEFINIȚII

Precizie: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele „relevanței” acesteia. Termenul este deseori utilizat în paralel cu termenul „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Categoria I EPA: Substanțe chimice care produc implicație corozivă (distrugerea ireversibilă a țesutului ocular) sau corneană sau iritație care persistă mai mult de 21 de zile (2).

Regulamentul CLP al UE: [Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor): Pune în aplicare în Uniunea Europeană (UE) GHS al ONU de clasificare a substanțelor chimice (substanțe și amestecuri).

Rată de rezultate fals negative: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: Proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

FL_{20}: Poate fi estimată prin determinarea concentrației la care substanța chimică testată provoacă 20 % scurgere de fluoresceină prin stratul celular.

Scurgere de fluoresceină: Cantitatea de fluoresceină care trece prin stratul celular, măsurată cu ajutorul unui spectrofluorimetru.

GHS [Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Națiunilor Unite (ONU)]: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, de sănătate și de mediu și care abordează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță astfel încât să transmită informații cu privire efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului.

Categoria 1 GHS: Producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Amestec: Utilizat în contextul GHS al ONU ca însemnând un amestec sau o soluție compusă din două sau mai multe substanțe care nu intră în reacție.

Martor negativ: O probă replică netratată care conține toate componentele sistemului de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

▼M7

Neclasificat: Substanțe care nu sunt clasificate în categoriile 1, 2A sau 2B din GHS al ONU; categoriile 1 sau 2 din Regulamentul CLP al UE; sau categoriile I, II sau III de iritanți oculari EPA SUA.

Substanță având un caracter coroziv la nivel ocular: (a) O substanță chimică care provoacă leziuni tisulare ireversibile la nivel ocular. (b) Substanțe chimice sunt clasificate în categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; sau categoria I EPA SUA.

Iritant ocular: (a) O substanță chimică care provoacă o modificare reversibilă la nivel ocular în urma aplicării pe suprafața anterioară a ochiului; (b) Substanțe chimice clasificate în categoriile 2A sau 2B din GHS al ONU; categoria 2 din Regulamentul CLP al UE; sau categoriile II sau III de iritanți oculari EPA SUA.

Substanță cu potențial iritant sever: (a) O substanță care provoacă lezarea tisulară la nivel ocular după aplicarea pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este reversibilă după 21 de zile de la aplicare sau care provoacă o deteriorare fizică gravă a vederii; (b) Substanțe chimice clasificate în categoria 1 din GHS al ONU; categoria 1 din Regulamentul CLP al UE; sau categoria I EPA SUA.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele unui sistem de testare și care a fost tratată cu o substanță chimică cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a răspunsului martorului pozitiv, amplitudinea răspunsului pozitiv nu trebuie să fie extremă.

Substanțe chimice de verificare: Un subset al listei de substanțe chimice de referință care pot fi utilizate de un laborator naiv pentru a demonstra performanțele cu metoda de testare de referință validată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop specific. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară și prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (8).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau inter-laboratoare.

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test care este în utilizare sistemică și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost stabilit pentru a furniza o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat, pentru toate situațiile de testare și substanțele chimice posibile.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea preciziei unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (8).

Lezarea oculară gravă: Reprezintă producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu substanța chimică de testat tratată și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent

▼M7

sau vehicul. Atunci când este testată în paralel cu un martor negativ, această probă indică, de asemenea, dacă solventul sau vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea preciziei unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare.

Substanță: Utilizată în contextul GHS al ONU ca elementele chimice și compușii acestora în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

Strategie de testare secvențială: O strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt revizuite, într-o anumită ordine, utilizând un proces al forței probante a datelor în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se efectuează o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Metodă de testare validată: O metodă de testare pentru care au fost finalizate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de semnalat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al acurateței și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (8).

Forța probantă a datelor: Procesul prin care se iau în considerare punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a se formula și a se susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

▼M7

Apendicele 3

SUBSTANȚE CHIMICE DE VERIFICARE PENTRU METODA DE TESTARE FL

Înainte de utilizarea sistematică a acestei metode de testare, laboratoarele trebuie să demonstreze performanțele tehnice proprii prin identificarea corectă a clasificării coroziunii oculare pentru cele 8 substanțe chimice recomandate în tabelul 1. Substanțele respective au fost selectate pentru a reprezenta intervalul răspunsurilor pentru iritația/coroziunea locală oculară, care se bazează pe rezultatele din testul *in vivo* pe ochi de iepure [TG 405, MT B.5 (5)] (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau „nicio categorie" în conformitate cu GHS al ONU. Cu toate acestea, ținând cont de utilitatea validată a testului FL (și anume, identificarea numai a substanțelor care au un caracter coroziv/potențial iritant sever la nivel ocular), există numai două rezultate ale testelor destinate clasificării (coroziv/iritant sever sau necoroziv/fără potențial iritant sever) pentru a demonstra performanțele. Alte criterii de selecție au fost disponibilitatea comercială a substanțelor chimice, disponibilitatea datelor de referință *in vivo* de calitate superioară și existența datelor de calitate superioară furnizate de metoda de testare FL. Din acest motiv, substanțele chimice de verificare au fost selectate din „documentul de revizuire a fondului pentru testul de scurgere de fluoresceină ca metodă alternativă de testare pentru iritația oculară" (8), care a fost utilizat pentru validarea retrospectivă a metodei de testare FL.

Tabelul 1

Substanțe chimice recomandate pentru demonstrarea performanțelor tehnice prin FL

Substanță chimică	Nr. CAS	Clasă chimică (1)	Formă fizică	Clasificare in vivo (2)	Clasificare in vitro (3)
Clorură de benzalconiu (5 %)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Clorhidrat de prometazină	58-33-3	Amină/ amidină, heterociclic, compus organic de sulf	Solid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Hidroxid de sodiu (10 %)	1310-73-2	Alcalină	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
Lauril sulfat de sodiu (15 %)	151-21-3	Acid carboxilic (sare)	Lichid	Categoria 1	Coroziv/Iritant sever
4-carboxi-benzaldehidă	619-66-9	Acid carboxilic, aldehidă	Solid	Categoria 2 (A)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Nitrat de amoniu	6484-52-2	Sare anorganică	Solid	Categoria 2 (A)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Etil-2-metil-acetoacetat	609-14-3	Cetonă, ester	Lichid	Categoria 2 (B)	Necoroziv/Fără potențial iritant sever
Glicerol	56-81-5	Alcool	Lichid	Nicio categorie	Necoroziv/Fără potențial iritant sever

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

(1) Clasele chimice au fost desemnate pentru fiecare substanță chimică de testat prin utilizarea unei scheme de clasificare standard, pe baza sistemului de clasificare al National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (disponibil la http//www.nlm.nih.gov/mesh)

(2) Pe baza rezultatelor din testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG 405, MT B.5) și prin utilizarea GHS al ONU și a Regulamentului CLP al UE.

(3) Pe baza rezultatelor obținute cu FL [Protocolul nr. 71(6) INVITTOX]

▼M7

B.62. TESTUL COMET IN VIVO PE CELULE ALCALINE DE MAMIFERE

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 460 (2016). Testul Comet *in vivo* alcalin (electroforeză în gel pe celule izolate) (denumit în continuare simplu „testul comet”) este utilizat pentru detectarea întreruperilor lanțului ADN în celule sau nuclee unice de la mai multe țesuturi de animale, de regulă rozătoare, care au fost expuse la material (materiale) cu potențial genotoxic. Testul Comet a fost revizuit și recomandări au fost publicate de către diferite grupuri de experți (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) (10). Această metodă de testare este parte a unei serii de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. A fost elaborat un document al OCDE care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică (11) și care trece în revistă modificările efectuate recent asupra orientărilor respective.

Scopul testului Comet este de a identifica substanțele chimice care provoacă lezarea ADN-ului. În condiții alcaline (pH >13), testul Comet poate detecta întreruperi simple sau duble ale lanțului, care rezultă, de exemplu, din interacțiuni directe cu ADN-ul, situsuri labile alcaline sau ca o consecință a întreruperilor tranzitorii ale lanțului ADN rezultate în urma procesului de reparare prin excizie a ADN-ului. Aceste întreruperi ale lanțului pot fi reparate, având ca rezultat lipsa efectelor persistente, pot fi letale pentru celulă sau pot fi fixate pe o mutație având ca rezultat o schimbare viabilă permanentă. Acestea pot conduce, de asemenea, la lezarea cromozomială care este asociată, de asemenea, cu numeroase boli umane, inclusiv cancerul.

Un studiu de validare formală a testului Comet *in vivo* pe rozătoare a fost efectuat în perioada 2006-2012, sub coordonarea Centrului japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM), în colaborare cu Centrul European pentru validarea metodelor alternative (ECVAM), Comitetul de coordonare Interagenții pentru validarea metodelor alternative (ICCVAM) și Programul Național de toxicologie (NTP) al Centrului Interagenții pentru evaluarea metodelor toxicologice alternative (NICEATM) (12). Această metodă de analiză include utilizarea și limitările recomandate testului Comet și se bazează pe protocolul final (12) utilizat în studiul de validare, precum și pe date suplimentare relevante publicate și nepublicate (aflate în proprietatea laboratoarelor).

Definițiile termenilor cheie sunt prevăzute în apendicele 1. Este de remarcat faptul că mai multe platforme diferite pot fi utilizate pentru acest test (lame de microscop, spoturi în gel, plăci cu 96 de godeuri etc.). Din motive de simplitate, în restul prezentului document se utilizează termenul „lamă”, dar acesta cuprinde toate celelalte platforme.

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

Testul Comet este o metodă de măsurare a întreruperilor lanțului ADN la celulele eucariote. Celulele/nucleele izolate integrate în agaroză pe o lamă se lizează cu detergent și o concentrație ridicată de sare. Această etapă de liză digeră membranele celulare și nucleare și permite eliberarea de bucle încolăcite de ADN, denumite în general nucleotide și fragmente de ADN. Electroforeza la pH ridicat are ca rezultat structuri asemănătoare cu o cometă, care, prin utilizarea colorării corespunzătoare cu fluoresceină, pot fi observate prin microscopie cu fluorescență; fragmentele de ADN migrează de la „capăt” la „coadă” în funcție de dimensiunile acestora și intensitatea cozii cometei în raport cu intensitatea totală (cap plus coadă) reflectă valoarea întreruperii ADN-ului (13) (14) (15).

Testul Comet *in vivo* alcalin este relevant în special pentru evaluarea pericolelor genotoxice prin faptul că răspunsurile testului sunt dependente de ADME (absorbție, distribuție, metabolism și excreție) *in vivo* și, de asemenea, de procesele de regenerare de ADN. Acestea pot să varieze între specii, între țesuturi și între tipurile de lezare la nivel de ADN.

▼M7

Pentru a îndeplini cerințele în materie de bunăstare a animalelor, în special reducerea utilizării animalelor [principiile 3R – înlocuire, reducere, rafinare (replacement, reduction, refinement)], acest test poate fi integrat, de asemenea, în alte studii toxicologice, de exemplu studii de toxicitate cu doze repetate (10) (16) (17), sau criteriul final poate fi combinat cu alte criterii finale de genotoxicitate precum testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite de mamifere (18) (19) (20). Testul Comet este cel efectuat mai adesea la rozătoare, însă a fost aplicat și altor specii de mamifere și nemamifere. Utilizarea speciilor de nerozătoare trebuie să fie justificată din punct de vedere științific și etic, de la caz la caz și se recomandă cu fermitate ca testul Comet să se efectueze asupra altor specii decât rozătoarele numai ca parte a unui alt studiu de toxicitate și nu ca un test independent.

Selecția căii de expunere și a țesutului (țesuturilor) care urmează să fie studiat(e) se determinată pe baza tuturor cunoștințelor disponibile/existente cu privire la substanțele chimice de testat, de exemplu, calea de expunere umană destinată/anticipată, metabolismul și distribuția, potențialul de efecte la punctul de contact, alerte structurale, alte date cu privire la genotoxicitate și toxicitate și scopul studiului. Prin urmare, după caz, potențialul genotoxic al substanțelor chimice de testat poate fi testat în țesutul (țesuturile) țintă cu efecte carcinogene și/sau alte efecte toxice. Testul este considerat util, de asemenea, la investigarea suplimentară a genotoxicității detectate printr-un sistem *in vitro*. Efectuarea unui test Comet *in vivo* pe un țesut de interes este necesară atunci când se așteaptă în mod rezonabil ca țesutul de interes să fie expus în mod adecvat.

Testul a fost validat în mod extensiv pentru țesuturi somatice de șobolani masculi în cadrul unor studii în colaborare precum studiul JaCVAM (12) și Rothfuss *et al*., 2010 (10). În studiul internațional de validare JaCVAM, a fost utilizat ficat și stomac. Ficatul, deoarece este cel mai activ organ în ceea ce privește metabolismul substanțelor chimice și, de asemenea, în mod frecvent, un organ țintă pentru carcinogenitate Stomacul, în primul rând pentru că, de regulă, acesta este primul punct de contact pentru substanțele chimice după expunerea orală, cu toate că și alte domenii ale tractului gastrointestinal precum duodenul și jejunul se iau în considerare, de asemenea, ca țesuturi punct de contact și pot fi considerate mai relevante pentru oameni decât stomacul glandular de rozătoare. Se acordă atenție deosebită pentru a se asigura că astfel de țesuturi nu sunt expuse la concentrații prea ridicate de substanță chimică de testat (21). Tehnica se aplică, în principiu, pentru toate țesuturile din care pot fi derivate suspensii cu celule/nuclee unice. Datele care fac obiectul unui drept de proprietate al mai multor laboratoare demonstrează aplicarea cu succes a acesteia la mai multe țesuturi diferite și există mai multe publicații care arată aplicabilitatea tehnicii la organe sau țesuturi, altele decât ficat și stomac, de exemplu jejun (22), rinichi (23)(24), piele (25) (26)sau vezică urinară (27)(28), lavaj de celule din plămâni și branhoalveole (relevante pentru studii asupra substanțelor chimice inhalate) (29) (30) și au fost efectuate teste, de asemenea, în mai multe organe (31) (32).

Cu toate că poate exista un interes cu privire la efectele genotoxice în celule germinale, se remarcă faptul că testul Comet alcalin standard, astfel cum este descris în prezenta metodă de testare, nu este considerat adecvat pentru măsurarea întreruperilor lanțului ADN în celule germinale mature. Având în vedere faptul că au fost raportate niveluri de fond ridicate și variabile de lezare a ADN-ului într-o revizuire a literaturii de specialitate cu privire la utilizarea testului Comet pentru genotoxicitatea celulelor germinale (33), se consideră necesară efectuarea de modificări de protocol, împreună cu îmbunătățirea studiilor de standardizare și validare înainte de includerea în metoda de testare a testului Comet pe celule germinale mature (de exemplu, spermatozoidul). În plus, regimul de expunere recomandat descris în această metodă de testare nu este optim și ar fi necesari timpi de expunere sau perioade de prelevare mai lungi pentru o analiză pertinentă a întreruperilor lanțului ADN în spermatozoizii maturi. În referințele bibliografice au fost descrise efectele genotoxice astfel cum au fost măsurate prin testul Comet pe celule testiculare în diferite etape de diferențiere (34) (35). Cu toate acestea, se remarcă faptul că gonadele conțin un amestec de celule somatice și germinale. Din acest motiv, rezultate pozitive în întreaga gonadă (testicul) nu reflectă în mod necesar leziunea la nivelul celulei germinale; totuși, acestea indică faptul că substanța (substanțele) chimică(e) de testat și/sau metaboliții acesteia (acestora) a (au) ajuns la gonadă.

▼M7

Legăturile încrucișate nu pot fi detectate în mod fiabil în condițiile experimentale standard ale testului Comet. În anumite condiții experimentale modificate, legăturile încrucișate ADN- ADN și ADN-proteină și alte modificări de bază precum bazele oxidate ar putea fi detectate (23) (36) (37) (38) (39). Cu toate acestea, ar fi necesare lucrări suplimentare pentru a caracteriza în mod corespunzător modificările necesare de protocol. Prin urmare, detectarea agenților de formare a legăturilor încrucișate nu este scopul principal al testului astfel cum este descris în prezenta metodă de testare. Testul nu este adecvat, inclusiv cu modificări, pentru detectarea substanțelor aneugene.

Având în vedere stadiul actual al cunoștințelor, mai multe limitări suplimentare (a se vedea apendicele 3) sunt asociate cu testul Comet *in vivo*. Se preconizează faptul că metoda de testare va fi verificată în viitor și, în cazul în care este necesar, va fi revizuită ținând cont de experiența acumulată.

Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare destinat, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL METODEI

Animalele se expun la substanța chimică de testat printr-o cale de expunere corespunzătoare. La punctele 36-40 se prezintă o descriere detaliată a dozării și a prelevării de probe. La perioada (perioadele) de prelevare de probe selecționată(e), se disecă țesuturile de interes și se prepară suspensiile de celule/nuclee unice (se poate efectua perfuzarea *in situ* în cazul în care se consideră util, de exemplu, ficat) și se acoperă în agar moale astfel încât acestea sa fie imobilizate pe lame. Se tratează celule/nucleele cu tampon de lizare pentru a îndepărta membrana celulară și/sau nucleară și se expun la alcalinitate puternică, de exemplu pH $\geq$ 13 pentru a permite corectarea ADN-ului și eliberarea buclelor și fragmentelor de ADN destinse. Se supune ulterior electroforezei ADN-ul nuclear în agar. Moleculele de ADN normale nefragmentate rămân în poziția în care ADN-ul nuclear a fost în agar, în timp ce orice buclă de ADN fragmentată sau destinsă ar migra spre anod. După electroforeză, se vizualizează ADN-ul prin utilizarea colorării fluorescente corespunzătore. Se analizează preparatele utilizând un microscop și sisteme de analiză a imaginii complete sau semiautomate. Cantitatea de ADN care a migrat în timpul electroforezei și distanța de migrare reflectă cantitatea și mărimea fragmentelor de ADN. Există mai multe criterii finale pentru testul Comet. Conținutul de ADN la coadă (% ADN la coadă sau % de intensitate în coadă) a fost recomandat pentru evaluarea leziunilor ADN-ului (12) (40) (41) (42). După analiza unui număr suficient de nuclee, se analizează datele cu ajutorul unor metode adecvate pentru a evalua rezultatele testării.

Se remarcă faptul că modificarea diferitelor aspecte ale metodologiei, inclusiv pregătirea probelor, condițiile de electroforeză, parametrii analizei vizuale (de exemplu, intensitatea colorației, intensitatea luminii becului de la microscop și utilizarea filtrelor de microscop și dinamică camerei) și condițiile ambiante (de exemplu, iluminatul de fundal), au fost investigate și acestea pot afecta migrarea ADN-ului (43) (44) (45) (46).

VERIFICAREA COMPETENȚEI LABORATORULUI

Fiecare laborator trebuie să își stabilească competența experimentală în testul Comet prin demonstrarea capacității de a obține suspensii de celule sau nuclee unice de o calitate suficientă pentru fiecare țesut (țesuturi) țintă pentru fiecare specie utilizată. Se va evalua mai întâi calitatea preparatelor prin % de ADN la coadă pentru animalele tratate cu un vehicul care se încadrează într-un interval de reproductibilitate scăzută. Datele actuale sugerează faptul că media pentru % de ADN la coadă pe grup (pe baza mediei valorilor medii – a se vedea punctul 57 pentru detalii cu privire la acești termeni) pentru ficatul de șobolan nu trebuie să depășească, de preferință, 6 %, valoare care ar fi în concordanță cu valorile din procesul de validare JaCVAM (12) și din alte date care fac obiectul unui drept de proprietate și publicate. Nu există suficiente date la acest moment pentru a face

▼M7

recomandări cu privire la plaje de valori optime sau acceptabile pentru alte țesuturi. Acest lucru nu exclude utilizarea altor țesuturi, în cazul în care acest lucru este justificat. Raportul de testare ar trebui să furnizeze revizuirea corespunzătoare a efectuării testului Comet pe țesuturile respective în comparație cu literatura de specialitate publicată sau cu date care fac obiectul unui drept de proprietate. În primul rând, este de dorit un interval scăzut de % de ADN la coadă în martori pentru a furniza un interval dinamic pentru a detecta un rezultat pozitiv. În al doilea rând, fiecare laborator trebuie să fie capabil să reproducă răspunsuri preconizate pentru mutageni și promutageni direcți cu modalități diferite de acțiune, astfel cum se sugerează în tabelul 1 (punctul 29).

Se pot selecta substanțe pozitive, de exemplu din studiul de validare JaCVAM (12) sau din alte date publicate (a se vedea punctul 9), dacă este cazul, cu justificare și demonstrând răspunsuri clar pozitive pentru țesuturile de interes. Se demonstrează, de asemenea, capacitatea de detectare a efectelor slabe a mutagenilor cunoscuți, de exemplu EMS la doze mici, de exemplu, prin stabilirea de relații doză-răspuns cu numere și spațiere de doze corespunzătoare. Eforturile inițiale se concentrează pe stabilirea competenței pentru țesuturile utilizate cel mai frecvent, de exemplu, ficatul de rozătoare, în cazul în care se poate efectua comparația cu datele existente și cu rezultatele preconizate (12). Date de la alte țesuturi, de exemplu stomac/duoden/jejun/sânge etc., ar putea fi colectate concomitent. Laboratorul trebuie să demonstreze competență pentru fiecare țesut individual de la fiecare specie pe care intenționează să o studieze și va trebui să demonstreze că un răspuns pozitiv acceptabil cu un mutagen cunoscut (de exemplu, EMS) poate fi obținut în țesutul respectiv.

Se colectează date cu privire la martorii negativi/vehicul astfel încât să se demonstreze reproductibilitatea răspunsurilor de date negative și să se asigure faptul că aspectele tehnice ale testului au fost controlate în mod corespunzător sau să se sugereze necesitatea de restabilire a unor plaje de valori cu privire la martorii anteriori (a se vedea punctul 22).

Se remarcă faptul că, în timp ce țesuturi multiple pot fi colectate la necropsie și prelucrate pentru testul Comet, laboratorul trebuie să fie competent în recoltarea de țesuturi multiple de la un singur animal, asigurându-se astfel că nu se omit eventualele leziuni ale ADN-ului și nu se compromite analiza Comet. Durata de timp de la eutanasiere până la îndepărtarea țesuturilor pentru procesare poate fi esențială (a se vedea punctul 44).

Bunăstarea animalelor trebuie luată în considerare în timp ce se dezvoltă în competența în acest test și, prin urmare, se pot utiliza țesuturi prelevate de la animale utilizate în alte teste atunci când se dezvoltă competența în diferite aspecte ale testului. În plus, este posibil să nu fie necesară efectuarea unui studiu complet pe parcursul etapelor de elaborare a unei noi metode de testare într-un laborator și un număr mai mic de animale și concentrații de testare poate fi utilizat atunci când se dezvoltă competențele necesare.

Date privind martorii testați anterior

În cursul verificărilor de competență, laboratorul trebuie să elaboreze o bază de date colectate anterior pentru a stabili plaje de valori și distribuții martor pozitiv și negativ pentru țesuturile și speciile relevante. În referințele bibliografice pot fi consultate recomandări cu privire la modul de a elabora și de a utiliza datele colectate anterior (și anume, criteriile de includere și de excludere a datelor din datele colectate anterior și criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (47). Țesuturile diferite și speciile diferite, precum și vehiculele și căile de administrare diferite pot furniza valori procentuale diferite de ADN la coadă ale martorului negativ. Prin urmare, este important să se stabilească plaje de valori pentru martorul negativ pentru fiecare țesut și specii. Laboratoarele trebuie să utilizeze metode de control al calității, cum ar fi grafice de control

▼M7

[de exemplu, diagrame C sau X-bar (48)], pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor lor și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în respectivul laborator. Selecția substanțelor martor pozitiv, a intervalelor de dozare și a condițiilor experimentale (de exemplu, condiții de electroforeză) corespunzătoare poate necesita optimizare, de asemenea, pentru detectarea efectelor slabe (a se vedea punctul 17).

Orice modificare la protocolul experimental se ia în considerare în ceea ce privește coerența acesteia cu bazele de date privind martorii testați anterior existente ale laboratorului. Orice inconsecvență majoră trebuie să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Selecția speciilor de animale

În mod normal, se utilizează șușe comune de laborator de la rozătoare sănătoase, tinere, adulte (6-10 săptămâni la începutul tratamentului, cu toate că sunt acceptabile, de asemenea, animale puțin mai în vârstă). Alegerea speciilor de rozătoare se bazează pe (i) speciile utilizate în alte studii de toxicitate (pentru a putea corela datele și de a permite studii integrate), (ii) speciile care au dezvoltat tumori într-un studiu de carcinogenitate (atunci când se analizează mecanismul carcinogenezei) sau (iii) speciile cu metabolismul cel mai relevant pentru oameni, dacă se cunoaște. În mod obișnuit, pentru acest test se utilizează șobolani. Cu toate acestea, se pot utiliza alte specii în cazul în care se furnizează justificarea etică și științifică.

Condiții de adăpostire și de hrănire a animalelor

În cazul rozătoarelor, temperatura din camera experimentală trebuie să fie în mod ideal de 22 °C (± 3 °C). În mod ideal, umiditatea relativă trebuie să fie de 50-60 %, fiind cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Spațiul se iluminează artificial, cu o alternanță de 12 ore lumină, 12 ore întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu furnizarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea regimului alimentar poate fi influențată de necesitatea de a asigura o proporție adecvată de substanță chimică de testat în cazul alegerii acestei căi de administrare. Rozătoarele se adăpostesc în grupuri mici (în general, nu mai mult de cinci) de același sex, în cazul în care nu se preconizează niciun comportament agresiv. Animalele pot fi adăpostite individual în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific. Se utilizează podele solide ori de câte ori este posibil deoarece podelele din plasă pot cauza leziuni grave (49). Se furnizează îmbogățirea adecvată a mediului de viață.

Pregătirea animalelor

Se distribuie animalele în mod aleatoriu în grupe martor și grupe de tratament. Se identifică în mod individual animalele și se aclimatizează la condițiile de laborator timp de cel puțin cinci zile înainte de începerea tratamentului. Se utilizează metoda cea mai puțin invazivă de identificare unică a animalelor. Metodele corespunzătoare includ aplicarea de inele, crotalierea, microciparea și identificarea biometrică. Secționarea degetului și a urechii nu sunt justificate din punct de vedere științific în cadrul acestor teste. Cuștile se dispun astfel încât posibilele efecte datorate amplasării acestora să fie reduse la minim. La începutul studiului, variația greutății animalelor trebuie să fie minimă și să nu depășească ± 20 %.

Pregătirea dozelor

Substanțele chimice de testat solide se dizolvă sau se suspendă în vehicule corespunzătoare sau se amestecă în hrana sau apa de băut înainte de administrarea la animale. Substanțele chimice de testat în stare lichidă se pot administra direct sau se pot dilua înainte de administrare. Pentru expuneri prin inhalare, substanțele chimice de testat se administrează sub formă de gaz, vapori sau un aerosol solid/lichid, în funcție de proprietățile fizico-chimice ale acestora (50) (51).

Se utilizează preparate proaspete de substanță chimică de testat, cu excepția cazului în care datele de stabilitate demonstrează caracterul acceptabil al depozitării și definesc condiții de depozitare corespunzătoare.

▼M7

Condiții de testare

Vehicul

Vehiculul nu trebuie să producă efecte toxice la volumele dozelor utilizate și nu trebuie să existe suspiciunea reacției chimice a acestuia cu substanțele chimice de testat. În cazul în care se utilizează alte vehicule decât cele recunoscute, includerea acestora necesită justificare prin date de referință care să indice compatibilitatea acestora în ceea ce privește animalele de experiență, calea de administrare și criteriul final. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare mai întâi utilizarea unui solvent/vehicul apos. Se remarcă faptul că unele vehicule (în special vehiculele în stare vâscoasă) pot provoca inflamații și pot crește nivelurile de fond ale întreruperilor lanțului ADN la punctul de contact, în special la administrări multiple.

Martori

Martori pozitivi

La acest moment, în fiecare test se include un grup de minim 3 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care se utilizează ambele sexe (a se vedea punctul 32), tratate cu o substanță martor pozitiv. În viitor, ar putea fi posibil să se demonstreze performanța adecvată pentru a reduce necesitatea de martori pozitivi. În cazul în care se utilizează mai multe perioade de prelevare (de exemplu, cu un singur protocol de administrare), este necesară includerea de martori pozitivi doar în una dintre perioadele de prelevare, dar se asigură un model echilibrat (a se vedea punctul 48). Nu este necesar să se administreze substanțe martor pozitiv testate în paralel pe aceeași cale precum substanța chimică de testat, cu toate că este importantă utilizarea aceleiași căi la măsurarea efectelor punctului de contact. Pentru substanțele martor pozitiv, trebuie să se demonstreze că acestea generează întreruperi ale lanțului ADN în toate țesuturile de interes pentru substanța chimică de testat, iar EMS este susceptibil de a fi martorul pozitiv selectat, întrucât aceasta a provocat întreruperi ale lanțului ADN în toate țesuturile care au fost studiate. Se selectează dozele de substanțe martor pozitive astfel încât să producă efecte moderate care evaluează în mod critic performanța și sensibilitatea testului și ar putea să se bazeze pe curbele doză-răspuns stabilite de laborator în cursul demonstrației de competență. Procentul de ADN la coadă la animalele martor pozitiv testate în paralel trebuie să fie în concordanță cu plaja de valori prestabilită a laboratorului pentru fiecare țesut și perioadă de prelevare de probe pentru specia respectivă (a se vedea punctul 16). În tabelul 1 sunt incluse exemple de substanțe martor pozitive și unele dintre țesuturile țintă ale acestora (la rozătoare). Se pot selecta alte substanțe decât cele indicate în tabelul 1, în cazul în care acest lucru poate fi justificat din punct de vedere științific.

Tabelul 1

Exemple de substanțe martor pozitive și unele dintre țesuturile țintă ale acestora

Substanțe și Nr. CAS RN
Etil metansulfonat (nr. CAS RN 62-50-0) pentru orice țesut
Etil nitrozouree (nr. CAS RN 759-73-9) pentru ficat și stomac, duoden sau jejun
Metil metansulfonat (nr. CAS RN 66-27-3) pentru ficat, stomac, duoden sau jejun, lavajul de celule pulmonare și bronhoalveolare (BAL), rinichi, vezică, plămâni, testicule și măduvă osoasă/sânge
N-metil-*N*'-nitro-*N*-nitrozoguanidină (nr. CAS RN: 70-25-7) pentru stomac, duoden sau jejun
1,2-dimetilhidrazină 2HCl (nr. CAS RN 306-37-6) pentru ficat și intestin
N-methyl-*N*-nitrozouree (nr. CAS RN 684-93-5) pentru ficat, măduvă osoasă, sânge, rinichi, stomac, jejun și creier.

▼M7

Martori negativi

Un grup de animale martor negativ, tratați numai cu vehicul și manipulate de altfel în același mod ca grupurile de tratament, se include la fiecare testare pentru fiecare perioadă de prelevare de probe și țesut. Procentul de ADN la coadă la animalele martor negativ trebuie să se încadreze în plaja de valori de fond prestabilite a laboratorului pentru fiecare țesut și perioadă de prelevare de probe pentru specia respectivă (a se vedea punctul 16). În absența unor date colectate anterior sau publicate cu privire la martori care să demonstreze faptul că vehiculul selectat, numărul de administrări sau calea de administrare nu induc efecte vătămătoare sau genotoxice, se efectuează studii inițiale înainte de efectuarea studiului complet pentru a stabili acceptabilitatea martorului vehicul.

PROCEDURĂ

Numărul și sexul animalelor

Cu toate că există puține date cu privire la animalele femele din care să se realizeze o comparație între sexe în ceea ce privește testul Comet, în general, alte răspunsuri de genotoxicitate *in vivo* sunt similare între masculi și femele și, prin urmare, majoritatea studiilor pot fi efectuate pe oricare dintre sexe. Datele care demonstrează diferențe relevante între masculi și femele (de exemplu, diferențele în materie de toxicitate sistemică, metabolism, biodisponibilitate etc., inclusiv, de exemplu, într-un studiu de stabilire a dozelor) încurajează utilizarea ambelor sexe. În acest caz, ar fi adecvat să se efectueze un studiu pe ambele sexe, de exemplu, ca parte dintr-un studiu de toxicitate la doze repetate. Utilizarea modelului factorial poate fi adecvată în cazul în care se utilizează ambele sexe. Apendicele 2 prezintă detalii cu privire la modalitatea de analiză a datelor utilizând acest model.

Se stabilește dimensiunea grupurilor la începutul studiului (și în timpul stabilirii competenței) cu scopul de a furniza cel puțin 5 animale analizabile de același sex sau din fiecare sex, în cazul în care se utilizează ambele sexe, pentru fiecare grup (mai puțin pentru grupul martor pozitiv testat în paralel – a se vedea punctul 29). În cazul în care expunerea umană la substanțe chimice este specifică unui anumit sex, cum ar fi, de exemplu, în cazul unor produse farmaceutice, testul se efectuează utilizând sexul corespunzător. Ca îndrumare pentru cerințe maxime tipice animalelor, un studiu efectuat în conformitate cu parametrii stabiliți la punctul 33 cu trei grupuri de dozare și martori pozitivi și negativi testați în paralel (fiecare grup compus din cinci animale de același sex) ar necesita între 25 și 35 de animale.

SCHEMĂ DE TRATAMENT

Se administrează tratament zilnic animalelor timp de 2 sau mai multe zile (și anume, două sau mai multe tratamente la intervale de 24 de ore) și se colectează probe o dată la 2-6 h (sau la T_{max}) după ultimul tratament (12). Se acceptă probe provenite din regimuri de dozare prelungite (de exemplu, dozare zilnică timp de 28 de zile). Combinarea cu succes a testul *in vivo* de micronucleu pe eritrocite cu testul Comet a fost demonstrată (10) (19). Cu toate acestea, trebuie acordată atenție deosebită logisticii implicate în prelevarea țesutului pentru analiza Comet, alături de cerințele de prelevare de țesuturi pentru alte tipuri de evaluări toxicologice. Recoltarea la 24 de ore după ultima doză, care este specifică pentru un studiu de toxicitate generală, nu este adecvată în majoritatea cazurilor (a se vedea punctul 40 cu privire la perioada de prelevare). Utilizarea altor scheme de tratament și prelevare se justifică (a se vedea apendicele 3). De exemplu, se poate utiliza tratament unic cu prelevare multiplă, cu toate acestea, se remarcă faptul că vor fi necesare mai multe animale pentru un studiu cu administrare unică din cauza necesității unor perioade de prelevare multiple, dar în unele cazuri acest lucru poate fi preferabil, de exemplu, atunci când substanța chimică de testat induce toxicitate excesivă în urma administrărilor repetate.

▼M7

Indiferent de modalitatea în care testul este efectuat, acesta este acceptabil atât timp cât substanța chimică de testat furnizează un răspuns pozitiv sau, în cazul unui studiu negativ, atât timp cât s-au demonstrat probe directe sau indirecte ale expunerii sau toxicității țesutului (țesuturilor) țintă sau în cazul în care doza limită a fost atinsă (a se vedea punctul 36).

Substanțele chimice de testat se pot administra, de asemenea, în doză fracționată, și anume două tratamente în aceeași zi la distanță de nu mai mult de 2-3 ore, pentru a facilita administrarea unui volum mare. În aceste condiții, perioada de prelevare a probelor se programează în funcție de ultima administrare a dozei (a se vedea punctul 40).

Doze

În cazul în care se efectuează un studiu preliminar de stabilire a dozelor din cauza faptului că nu există date adecvate disponibile din alte studii relevante pentru a contribui la selectarea dozei, acesta se efectuează în același laborator, utilizând aceeași specie, sușă, sex și regimul de tratament care urmează să fie utilizate în studiul principal, în conformitate cu abordările actuale pentru efectuarea de studii de stabilire a dozelor. Studiul trebuie să aibă ca obiectiv identificarea dozei maxime tolerate (DMT), definită ca doza care induce efecte toxice ușoare în raport cu durata perioadei de studiu (de exemplu, semne clinice clare precum comportament sau reacții anormale sau scăderea ușoară a greutății corporale sau citotoxicitate în țesutul țintă), dar nu decesul sau semne de durere, suferință sau stres care necesită eutanasiere. În cazul unei substanțe chimice de testat netoxică cu o perioadă de administrare de 14 zile sau mai mult, doza maximă (limită) este de 1 000 mg/kg greutate corporală/zi. În cazul perioadelor de administrare de mai puțin de 14 zile, doza maximă (limită) este de 2 000 mg/kg greutate corporală/zi. În cazul anumitor tipuri de substanțe chimice de testat (de exemplu, produsele farmaceutice umane) care fac obiectul unor reglementări specifice, aceste limite pot varia.

Substanțele chimice care prezintă saturația proprietăților toxicocinetice sau care provoacă procese de detoxifiere care pot conduce la o diminuare a expunerii după administrare pe termen lung pot face excepție de la criteriile de stabilire a dozelor și se evaluează de la caz la caz.

Atât pentru versiunea acută, cât și pentru cea subacută a testului Comet, în plus față de doza maximă (DMT, doza maximă posibilă, expunerea maximă sau doza limită), se selectează o serie derivată de cel puțin două doze suplimentare, spațiate în mod corespunzător (de preferință separate cu mai puțin de 10) pentru fiecare moment de prelevare pentru a demonstra răspunsuri legate de doză. Cu toate acestea, dozele utilizate acoperă, de asemenea, de preferință, o plajă de valori de la valoarea maximă până la valoarea care provoacă toxicitate mică sau nu provoacă toxicitate. Atunci când se observă toxicitate în țesutul țintă la toate dozele testate, se recomandă efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice (a se vedea punctele 54-55). Studiile care au ca scop investigarea suplimentară completă a formei curbei doză-răspuns pot necesita un grup (grupuri) de dozaj suplimentar(e).

Administrarea dozelor

La elaborarea unui test se ia în considerare calea anticipată de expunere umană. Prin urmare, căile de expunere precum alimentația, apa potabilă, expunerea locală, subcutanată, intravenoasă, calea orală (prin gavaj), inhalarea, expunerea intratraheală sau implantarea pot fi alese ca fiind justificate. În orice caz, calea se alege pentru a asigura expunerea adecvată a țesutului (țesuturilor) țintă. Injecția intraperitoneală nu se recomandă, în general, deoarece nu este o cale tipică relevantă de expunere umană și se utilizează doar cu justificare specifică (de exemplu, unele substanțe martor pozitiv, în scop investigativ sau pentru anumite medicamente care se administrează pe calea intraperitoneală). Volumul maxim de lichid care se poate administra prin gavaj sau prin injecție într-o

▼M7

singură repriză depinde de dimensiunea animalului de laborator. Volumul nu trebuie să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100g greutate corporală. Se justifică utilizarea unor volume mai mari decât această valoare (dacă acest lucru este permis de legislația privind bunăstarea animalelor). Ori de câte ori este posibil, se realizează diferite niveluri de dozare prin ajustarea concentrației formulei de dozare pentru a asigura un volum constant în raport cu greutatea corporală la toate nivelurile de dozare.

Prelevarea de probe

Prelevarea de probe este o variabilă esențială deoarece este determinată de perioada necesară pentru ca substanțele chimice de testat să atingă concentrația maximă în țesutul țintă și pentru provocarea întreruperilor lanțului ADN, dar înainte ca aceste întreruperi să fie îndepărtate, reparate sau să conducă la moarte celulară. Persistența unor leziuni care conduc la întreruperile lanțului ADN detectate de testul Comet poate fi foarte scurtă, cel puțin în cazul unor substanțe chimice testate *in vitro* (52) (53). În consecință, în cazul în care sunt suspectate astfel de leziuni tranzitorii ale ADN-ului, se iau măsuri pentru a reduce pierderile acestora prin asigurarea prelevării țesuturilor la momente suficient de timpurii, inclusiv mai devreme decât la momentele implicite indicate mai jos. Momentul (momentele) de prelevare optim(e) poate (pot) fi specific(e) substanței chimice sau căii de administrare, având ca rezultat, de exemplu, expunerea rapidă a țesutului cu administrare intravenoasă sau expunere prin inhalare. În consecință, după caz, se determină momentele de prelevare pe baza datelor cinetice (de exemplu, timpul (T_{max}) la care se atinge concentrația de vârf în plasmă sau țesut (C_{max}) sau la starea staționară la administrări multiple. În absența unor date cinetice, un compromis corespunzător pentru măsurarea genotoxicității este prelevarea de probe la 2-6 ore de la ultimul tratament pentru două sau mai multe tratamente sau atât la 2-6 h, cât și la 16-26 h după o singură administrare, cu toate că trebuie să se acorde atenție deosebită pentru a se efectua necropsia tuturor animalelor în același timp după ultima (singura) doză. Se pot utiliza, de asemenea, informații cu privire la apariția de efecte toxice în organele țintă (dacă sunt disponibile) pentru a selecta momente de prelevare adecvate.

Observații

Se recomandă efectuarea și înregistrarea observațiilor clinice generale referitoare la sănătatea animalelor cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași (aceleași) oră (ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare (54). Cel puțin de două ori pe zi, se examinează toate animalele pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea. Pentru studii pe durată mai mare, se cântăresc toate animalele cel puțin o dată pe săptămână și la finalizarea perioadei de testare. Se măsoară consumul de hrană la fiecare schimbare de alimente și cel puțin o dată pe săptămână. În cazul în care substanța chimică de testat este administrată prin apa de băut, se măsoară consumul de apă la fiecare schimbare de apă și cel puțin o dată pe săptămână. Animalele care prezintă indicatori neletali de toxicitate excesivă se eutanasiază înaintea de finalizarea perioadei de testare și, în general, nu se utilizează pentru analiza Comet.

Colectarea de țesuturi

Întrucât este posibil să se studieze inducția întreruperilor lanțului ADN (comete) în aproape orice țesut, justificarea alegerii țesutului (țesuturilor) care urmează a fi colectat(e) trebuie să fie clar definită și să fie bazată la motivele efectuării studiului, împreună cu orice date ADME, de genotoxicitate, de carcinogenitate și alte date toxicologice existente referitoare la substanțele chimice de testat care fac obiectul studiului. Factorii importanți de luat în considerare includ calea de administrare [pe baza căii (căilor) de expunere umană], distribuția și absorbția preconizată în țesuturi, rolul metabolismului și eventualele mecanisme de acțiune ale substanțelor chimice de testat. Țesutul cel mai frecvent studiat a fost ficatul, pentru care există cele mai multe date. Prin urmare, în lipsa oricăror informații

▼M7

generale și în cazul în care nu se identifică anumite țesuturi de interes, prelevarea de probe din ficat ar fi justificată, având în vedere faptul că aceasta este un loc principal de metabolism xenobiotic și deseori este extrem de expus atât la substanța (substanțe) mamă, cât și la metabolit (metaboliți). În unele cazuri, examinarea unui loc de contact direct (de exemplu, în cazul substanțelor chimice cu administrare orală, stomacul glandular sau duodenul/ jejunul sau în cazul substanțelor chimice inhalate, plămânii) poate fi cea mai relevantă. Se selectează țesuturi suplimentare sau alternative pe baza motivelor specifice pentru care se efectuează testul, dar examinarea de țesuturi multiple de la aceleași animale ar putea fi utilă, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat competența pentru țesuturile respective și competența în manipularea de țesuturi multiple în același timp.

Pregătirea specimenelor

Pentru procesele descrise la punctele următoare (44-49), este important ca toate soluțiile sau suspensiile stabile să fie utilizate înainte de data expirării sau să fie proaspăt preparate, dacă este necesar. De asemenea, în următoarele paragrafe, timpii necesari pentru (i) îndepărtarea fiecărui țesut după necropsie, (ii) procesarea fiecărui țesut în suspensii celulare/de nuclee și (iii) procesarea suspensiei și pregătirea lamelor sunt considerați variabile critice (a se vedea secțiunea Definiții, apendicele 1) și trebuie să fi fost determinate intervale de timp acceptabile pentru fiecare dintre aceste etape în timpul stabilirii metodei și al demonstrării competențelor.

Animalele vor fi eutanasiate în conformitate cu legislația aplicabilă privind bunăstarea animalelor și principiile celor 3R, la momentul (momentele) oportun(e) de la ultimul tratament cu substanța chimică de testat. Se înlătură și se disecă țesutul (țesuturile) selectat(e) și o parte se colectează pentru testul Comet, iar în același timp, se secționează o porțiune din aceeași parte de țesut și se introduce în soluție de formaldehidă sau într-un fixator adecvat pentru o posibilă analiză histopatologică (a se vedea punctul 55) în conformitate cu metodele standard (12). Se pune în tampon de mărunțire țesutul pentru testul Comet, se spală suficient în tampon de mărunțire rece pentru a îndepărta sângele rezidual și se depozitează în tampon de mărunțire răcit cu gheață până la procesare. Se poate efectua, de asemenea, perfuzarea *in situ,* de exemplu, pentru ficat, rinichi.

Există mai multe metode publicate pentru izolarea celulelor/nucleelor. Printre acestea se numără mărunțirea țesuturilor precum ficatul și rinichii, răzuirea suprafețelor mucoase în cazul tractului gastrointestinal, omogenizarea și digestia enzimatică. Studiul de validare JaCVAM a studiat numai celule izolate și, prin urmare, în ceea ce privește stabilirea metodei și posibilitatea de a face trimitere la datele generate de studiul JaCVAM pentru demonstrarea performanțelor, se preferă celule izolate. Cu toate acestea, s-a constatat faptul că nu există nicio diferență esențială în ceea ce privește rezultatele testului, indiferent dacă s-au utilizat celule izolate sau nuclee (8). De asemenea, diferite metode pentru izolarea celulelor/nucleelor (de exemplu, omogenizare, mărunțire, digestie enzimatică și filtrare prin plasă) au furnizat rezultate comparabile (55). În consecință, se pot utiliza fie celule izolate, fie nuclee izolate. Un laborator trebuie să evalueze cu atenție și să valideze metodele specifice țesuturilor de izolare a celulelor/nucleelor unice. Astfel cum s-a discutat la punctul 40, persistența unor leziuni care conduc la întreruperi ale lanțului ADN detectate de testul Comet poate fi foarte scurtă (52) (53). Prin urmare, indiferent de metoda utilizată pentru a pregăti suspensiile de celule/nuclee unice, este important că țesuturile să fie prelucrate cât mai curând posibil după ce animalele au fost eutanasiate și să fie depozitate în condiții care să reducă îndepărtarea leziunilor (de exemplu, prin menținerea țesutului la temperatură scăzută). Suspensiile de celule se păstrează la rece până la utilizare, astfel încât să se poată demonstra variația minimă între probe și răspunsurile martorilor pozitivi și negativi corespunzătoare.

▼M7

PREGĂTIREA LAMELOR

Pregătirea lamelor se realizează cât mai curând posibil (în mod ideal, în termen de o oră) după prepararea celulei unice/nucleelor, dar intervalul de timp între decesul animalului și pregătirea lamelor se controlează în mod strict și se validează conform condițiilor laboratorului. Volumul suspensiei celulare adăugate la agaroza cu punct de topire scăzut (de regulă 0,5-1,0 %) pentru a pregăti lamele nu trebuie să reducă procentul de agaroză cu punct de topire scăzut la mai puțin de 0,45 %. Se va determina densitatea celulară optimă prin sistemul de analiză a imaginilor utilizat pentru examinarea cometelor.

Liză

Condițiile de liză, de asemenea, sunt variabile esențiale și pot interacționa cu întreruperile lanțului rezultate din anumite tipuri de modificări de ADN (anumite alchinări ale ADN-ului și aducții de bază). Prin urmare, se recomandă menținerea cât mai constantă posibil a condițiilor de liză pentru toate lamele în cadrul unui experiment. Odată preparate, se imersează lamele în soluție de liză răcită timp de cel puțin o oră (sau peste noapte) la aproximativ 2-8 °C în condiții de iluminare redusă, de exemplu lumină galbenă (sau ferite de lumină), evitând expunerea la lumină albă care ar putea conține componente UV. După această perioadă de incubație, se clătesc lamele pentru eliminarea reziduurilor de detergent și a sărurilor înainte de etapa de corectare alcalină. Acest lucru se poate realiza utilizând apă purificată, tampon de neutralizare sau tampon fosfat. Se poate utiliza, de asemenea, tampon de electroforeză. Această acțiune ar menține condiții alcaline în camera de electroforeză.

Corectare și electroforeză

Lamele se introduc în mod aleatoriu pe platforma unei unități de electroforeză de tip submarin care conține suficientă soluție de electroforeză astfel încât suprafețele lamelor să fie total acoperite (adâncimea acoperirii trebui să fie consecventă, de asemenea, de la o determinare la alta). În cazul altui tip de unități de electroforeză a testului Comet, și anume, prin răcire activă, circulație și sursă de alimentare de înaltă tensiune, o soluție cu o acoperire mai mare va rezulta într-un curent electric de o intensitate mai mare, în timp ce tensiunea electrică este păstrată constantă. La plasarea lamelor în cuva de electroforeză se utilizează un model echilibrat pentru a atenua orice tendință sau efect de margine în cuvă și pentru a reduce la minimum variabilitatea între loturi, de exemplu la fiecare determinare de electroforeză se utilizează același număr de lame de la fiecare animal în studiu și se includ probe de la grupuri diferite de dozare, martori negativi și martori pozitivi. Se lasă lamele pentru cel puțin 20 de minute pentru ca ADN-ul să se corecteze și ulterior se supun la efectroforeză în condiții controlate care vor maximiza sensibilitatea și gamă dinamică a testului (și anume, vor conduce la niveluri acceptabile de % de ADN la coadă pentru martorii negativi și pozitivi care maximizează sensibilitatea). Nivelul migrației de ADN este asociat în mod liniar cu durata de electroforeză și, de asemenea, cu potențialul (V/cm). Pe baza studiului JaCVAM, acesta ar putea fi de 0,7 V/cm timp de cel puțin 20 de minute. Durata efectroforezei este considerată o variabilă esențială și timpul de electroforeză se stabilește astfel încât să optimizeze gama dinamică. Timpii mai lungi de electroforeză (de exemplu, 30 sau 40 minute pentru a maximiza sensibilitatea), de regulă, conduc la răspunsuri pozitive mai puternice cu mutageni cunoscuți. Cu toate acestea, timpii mai lungi de electroforeză, de asemenea, conduc la migrație excesivă în probele martor. În fiecare experiment, tensiunea se menține constantă și variabilitatea în ceilalți parametri trebuie să se încadreze într-o plajă de valori restrânsă și specifică, de exemplu, în studiul JaCVAM, 0,7 V/cm a emis un curent de pornire de 300 mA. Adâncimea tamponului se ajustează pentru a îndeplini condițiile necesare și se menține pe tot

▼M7

parcursul experimentului. Se înregistrează curentul electric la începutul și la sfârșitul perioadei de electroforeză. Se determină, prin urmare, condițiile în timpul demonstrației inițiale a performanțelor în laboratorul în cauză, cu fiecare țesut studiat. Se menține la o temperatură scăzută soluția de efectroforeză pe tot parcursul procesului de corecție și electroforeză, de regulă la 2-10 °C (10). Se înregistrează temperatura soluției de efectroforeză la începutul procesului de corecție, la începutul electroforezei și la finalizarea electroforezei.

După finalizarea electroforezei, se imersează/spală lamele în tampon de neutralizare timp de cel puțin 5 minute. Gelurile pot fi colorate și punctate „proaspăt” (de exemplu, în decurs de 1-2 zile) sau pot fi deshidratate în punctarea ulterioară (de exemplu, în termen de 1-2 săptămâni după colorare) (56). Cu toate acestea, se validează condițiile în timpul demonstrației de competență și se obțin și se păstrează separat date colectate anterior pentru fiecare dintre aceste condiții. În cel din urmă caz, se deshidratează lamele prin imersie în etanol absolut timp de cel puțin 5 minute, se lasă la aer uscat și ulterior se depozitează fie la temperatura camerei, fie într-un container în frigider până la punctare.

Metode de măsurare

Se punctează cantitativ cometele utilizând un sistem de analiză a imaginii semiautomat sau automat. Se vor colora lamele cu colorație cu fluoresceină corespunzătoare, de exemplu, SYBR Gold, Green I, iodură de propidiu sau bromură de etidiu și se măsoară la o mărire adecvată (de exemplu, 200x) cu un microscop prevăzut cu epiflorescență și detectoare corespunzătoare sau o cameră digitală (de exemplu, CCD).

Celulele pot fi clasificate în trei categorii, astfel cum sunt descrise în atlasul imaginilor Comet (57), și anume, „punctabile”, „nepunctabile” și „arici” (a se vedea punctul 56 pentru discuții suplimentare). Pentru punctarea % de ADN la coadă se punctează numai celulele punctabile (cap și coadă definite în mod clar, fără interferență cu celulele vecine) pentru a se evita rezultatele distorsionate. Nu este necesar să se raporteze frecvența celulelor nepunctabile. Se determină frecvența celulelor arici pe baza punctării vizuale (având în vedere faptul că absența unui cap definit în mod clar va însemna că acestea nu sunt ușor de detectat prin analiza imaginii) pentru cel puțin 150 de celule pentru fiecare probă (a se vedea punctul 56) și se documentează în mod separat.

Se codifică în mod independent și se punctează „pe nevăzute” toate lamele de analizat, inclusiv cele cu martori pozitivi și negativi, astfel încât examinatorul să nu cunoască condiția de tratament. Se analizează cel puțin 150 de celule (cu excepția celulelor arici – a se vedea punctul 56) pe fiecare probă (pe țesut pentru fiecare animal). Punctarea a 150 de celule pentru fiecare animal la cel puțin 5 animale pe doză (mai puțin pentru martorul pozitiv testat în paralel – a se vedea punctul 29) furnizează o putere statistică adecvată conform analizei Smith *et al*., 2008 (5). În cazul în care se utilizează lame, aceasta ar putea fi de la 2 sau 3 lame punctate pentru fiecare probă atunci când se utilizează cinci animale pentru fiecare grup. Se observă mai multe zone ale lamelor la o densitate care să asigure că nu există suprapuneri de cozi. Se evită punctarea la marginea lamelor.

Întreruperile lanțului ADN în testul Comet pot fi măsurate prin criterii independente precum % de ADN la coadă, lungimea cozii și momentul cozii. Toate cele trei măsurători pot fi efectuate în cazul în care se utilizează un sistem software de analiză a imaginii. Cu toate acestea, % de ADN la coadă (cunoscut, de asemenea, ca % de intensitate la coadă) este recomandat pentru evaluarea și interpretarea rezultatelor (12) (40) (41) (42) și este determinat de intensitatea fragmentele de ADN în coadă, exprimată ca procent din intensitatea celulară totală (13).

▼M7

Lezarea și cititoxicitatea tisulară

Rezultatele pozitive în testul Comet nu se datorează numai genotoxicității; toxicitatea țesutului țintă, de asemenea, poate conduce la creșterea migrației ADN-ului (12) (41). Dimpotrivă, un nivel scăzut sau moderat de citotoxicitate este adesea observat la genotoxinele cunoscute (12), demonstrând faptul că nu este posibil să se facă o distincție între migrația ADN-ului indusă de genotoxicitate și cea indusă de citotoxicitate în testul Comet individual. Cu toate acestea, în cazul în care se observă creșteri ale migrației ADN-ului, se recomandă efectuarea unei examinări a unuia sau a mai multor indicatori ai citotoxicității, având în vedere faptul că acest lucru poate contribui la interpretarea descoperirilor. Se interpretează cu prudență creșterile migrației ADN-ului în prezența unor dovezi clare privind citotoxicitatea.

Au fost propuse mai multe măsuri ale citotoxicității și, dintre acestea, modificările histopatologice relevante sunt considerate o măsură relevantă de toxicitate tisulară. Observații precum inflamarea, infiltrarea celulară, modificările apoptotice sau necrotice au fost asociate cu creșterea migrației ADN-ului, cu toate că, astfel cum s-a demonstrat în cadrul studiului de validare JaCVAM (12), nu este disponibilă nicio listă definitivă a modificărilor histopatologice care sunt asociate întotdeauna cu migrația crescută a ADN-ului. Modificări ale măsurilor clinice chimice (de exemplu, AST, ALT) pot furniza, de asemenea, informații utile cu privire la lezarea tisulară și indicatorii suplimentari precum activarea caspazelor, colorația TUNEL, colorația Annexin V etc. pot fi luați în considerare, de asemenea. Cu toate acestea, există un număr limitat de date publicate cu privire la utilizarea celor din urmă pentru studii *in vivo* și unele pot fi mai puțin fiabile decât altele.

Aricii (sau norii, celulele fantomă) sunt celule care prezintă o imagine microscopică care constă într-un cap mic sau inexistent și cozi mari, difuze care sunt considerate a fi celule puternic lezate, cu toate că etiologia aricilor este incertă (a se vedea apendicele 3). Din cauza aspectului acestora, măsurătorile prin analiza imaginii a % de ADN la coadă nu sunt fiabile și, prin urmare, aricii se evaluează în mod separat. Se notează și se raportează apariția celulelor arici și se investighează și se interpretează cu prudență orice creștere semnificativă considerată a fi cauzată de substanța chimică de testat. Cunoștințele cu privire la potențialul mod de acțiune al substanțelor chimice de testat pot contribui la astfel de considerații.

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Unitatea experimentală este animalul, prin urmare, se prezintă sub formă de tabel atât datele individuale referitoare la fiecare exemplar, cât și rezultatele sintetice. Din cauza naturii ierarhice a datelor, se recomandă determinarea valorii medii de % ADN la coadă pentru fiecare lamă și calcularea mediei valorilor medii pentru fiecare animal (12). Se determină ulterior media pentru mediile fiecărui animal pentru a obține o medie a grupului. Toate aceste valori se includ în raport. Se pot utiliza abordări alternative (a se vedea punctul 53) în cazul în care acest lucru este justificat din punct de vedere științific și statistic. Analiza statistică se poate realiza utilizând o varietate de abordări (58) (59) (60) (61). Atunci când se selectează metodele statistice care urmează să fie utilizate, se ia în considerare necesitatea transformării (de exemplu, un log sau rădăcină pătrată) a datelor și/sau adăugarea unui număr redus (de exemplu 0,001) la toate valorile (inclusiv non-zero) pentru a atenua efectele valorilor celulare zero, astfel cum s-a discutat în referințele de mai sus. În apendicele 2 se furnizează detalii privind analiza interacțiunilor tratament/sex atunci când se utilizează ambele sexe, precum și analiza ulterioară a datelor în cazul în care fie se constată diferențe între acestea, fie nu se constată nicio diferență. Se raportează, de asemenea, date cu privire la toxicitate și semnele clinice.

Criterii de acceptabilitate

Acceptarea unui test se bazează pe următoarele criterii:

a. Martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru adăugarea la baza de date colectate anterior cu privire la martorii negativi a laboratorului, astfel cum este descris la punctul 16.

▼M7

b. Martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 29) trebuie să determine răspunsuri care sunt compatibile cu cele provenite din baza de date colectate anterior cu privire la martorii pozitivi și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic, comparativ cu martorul negativ.

c. Analizarea unui număr adecvat de celule și doze (punctul 52 și punctele 36-38).

d. Criteriile de selectare a dozei maxime sunt consecvente cu cele descrise la punctul 36.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă în cazul în care:

a. cel puțin una dintre dozele de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b. atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de doză,

c. oricare dintre rezultate se află în afara distribuției de date colectate anterior cu privire la martorii negativi pentru o anumită specie, vehicul, cale, țesut și număr de administrări.

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, substanța chimică de testat este considerată, prin urmare, ca fiind capabilă să inducă întreruperea lanțului ADN în țesuturile studiate în prezentul sistem de testare. În cazul în care se îndeplinesc numai unul sau două dintre aceste criterii, a se vedea punctul 62.

Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care:

a. niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

b. nu există nicio creștere legată de concentrație la evaluarea prin intermediul unui test de stabilire a tendinței.

c. toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date colectate anterior cu privire la martorii negativi pentru o anumită specie, vehicul, cale, țesut și număr de administrări.

d. au fost demonstrate probe directe sau indirecte ale expunerii sau toxicității țesutului (țesuturilor) țintă.

Substanța chimică testată este considerată, prin urmare, ca fiind incapabilă să inducă întreruperea lanțului ADN în țesuturile studiate în prezentul sistem de testare.

Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv (și anume, nu se îndeplinesc toate criteriile listate la punctul 59 sau 60) și pentru a contribui la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, se evaluează datele de către experți și/sau prin anchete suplimentare efectuate, dacă este justificat din punct de vedere științific. Ar putea fi utilă punctarea de celule suplimentare (după caz) sau repetarea experimentului, cu posibila utilizare a unor condiții experimentale optimizate (de exemplu, spațierea dozelor, alte căi de administrare, alte momente de prelevare sau alte țesuturi).

În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative și, prin urmare, acesta va fi concluzionat ca fiind echivoc.

▼M7

Pentru a evalua relevanța biologică a unui rezultat pozitiv sau echivoc sunt necesare informații cu privire la citotoxicitatea în țesutul țintă (a se vedea punctele 54-55). În cazul în care se observă rezultate pozitive sau echivoce numai în prezența unor dovezi clare de citotoxicitate, studiul va fi concluzionat ca echivoc pentru genotoxicitate, cu excepția cazului în care există suficiente informații care să sprijine o concluzie definitivă. În cazul unui rezultat negativ al studiului cu semne de toxicitate la toate dozele testate, se poate recomanda efectuarea unui studiu suplimentar la doze netoxice.

Raport de testare

Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, dacă este disponibil;

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și proprietăți fizico-chimice suplimentare relevante;

— identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, Codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea impurităților chimice, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic, etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— caracterizate, în măsura în care este posibil, prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent/vehicul

— justificarea alegerii solventului/vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunosc;

— pregătirea formulărilor de doză;

— determinări analitice cu privire la formulări (de exemplu, stabilitate, omogenitate, concentrații).

Animalele de experiență:

— specii/sușa utilizată și justificarea științifică și etică pentru alegere;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursă, condiții de adăpostire, hrană, îmbogățirea etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul și la sfârșitul testului, inclusiv intervalul de greutate corporală, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup.

Condiții de testare:

— date cu privire la martori pozitivi și negativi (solvent/vehicul);

▼M7

— rezultatele studiului de stabilire a dozelor (dacă s-a efectuat);

— justificarea selecției nivelului de doză administrată;

— detalii privind prepararea substanței chimice de testat;

— detalii privind modalitatea de administrare a substanței chimice de testat;

— justificarea căii de administrare;

— locul de injecție (pentru studiile subcutanate sau intravenoase);

— metode de preparare a probelor, dacă sunt disponibile, analize histopatologice, în special pentru o substanță chimică ce furnizează un răspuns Comet pozitiv;

— justificarea selecției țesutului;

— metode prin care se verifică dacă substanța chimică de testat a ajuns în țesutul țintă sau în circulația generală, în cazul în care se obțin rezultate negative;

— doza efectivă (mg/kg greutate corporală/zi) calculată din concentrația substanței chimice de testat (ppm) în hrană/ apă potabilă și consum, dacă este cazul;

— detalii privind calitatea hranei și a apei;

— descrierea amănunțită a schemelor de tratament și de prelevare a probelor și justificarea alegerilor (de exemplu, date toxicocinetice, dacă sunt disponibile);

— metoda de ameliorare a durerii, analgezice;

— metoda de eutanasiere;

— proceduri pentru izolarea și păstrarea țesuturilor;

— metode pentru pregătirea suspensiei de celule unice/nuclee;

— sursa și numărul lotului tuturor reactivilor (dacă este posibil);

— metode de evaluare a citotoxicității;

— condiții de electroforeză;

— tehnicile de colorare utilizate;

— metodele de punctare și de măsurare a cometelor.

Rezultate:

— Observații clinice generale, dacă există, înaintea și pe durata perioadei de testare pentru fiecare animal;

— dovezi de citotoxicitate, dacă au fost efectuate;

▼M7

— pentru studiile mai lungi de o săptămână: Greutățile corporale individuale pe parcursul studiului, inclusiv intervalul de greutate corporală, valoarea medie și deviația standard pentru fiecare grup; consumul de hrană;

— relația doză-răspuns, în cazurile în care este evidentă;

— pentru fiecare țesut/animal, % de ADN la coadă (sau alte măsuri, în cazul în care se aleg) și valorile medii pentru fiecare lamă, valori medii pentru fiecare animal și valorile medii pentru fiecare grup;

— date privind martorii negativi testați în paralel și date colectate anterior cu privire la martorii negativi, cu intervale, valori medii/mediane și deviații standard pentru fiecare țesut evaluat;

— date privind martorii pozitivi testați în paralel și date colectate anterior cu privire la martorii negativi;

— pentru țesuturi altele decât ficatul, o curbă doză-răspuns utilizând martorul pozitiv. Acesta poate proveni din date colectate în cursul demonstrației de competență (a se vedea punctele 16-17) și trebuie să fie însoțită de o justificare, cu trimiteri la literatura de specialitate la zi pentru caracterul adecvat al amplitudinii și dispersiei răspunsurilor la martori în țesutul respectiv;

— analize statistice și metode aplicate; și criteriile în funcție de care un răspuns este considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— frecvența celulelor arici în fiecare grup și pentru fiecare animal.

Discutarea rezultatelor

Concluzie

Referințe

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, p. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, p. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, p. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, p. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, p. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, p. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, p. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, p. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, p. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, p. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, p. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, p. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, p. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, p. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, p. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, p. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, p. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, p. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, p. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, p. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,Vol. 393/1-2, p. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, p. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, p. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, p. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, p. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, p. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, p. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, p. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, p. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, p. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, p. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, p. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, p. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, p. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, p. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, p. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), p. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, p. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, p. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, p. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, p. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, p. 4145.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, p. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Capitolul B.8 din prezenta anexă: *Toxicitatea subacută la inhalare: Studiu de 28 de zile.*

(51) Capitolul B.29 din prezenta anexă: *Toxicitatea subacută la inhalare: Studiu de 90 de zile.*

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, p. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, p. 3541.

(54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, p. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, p.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co.,Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, p. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, p. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, p. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, p. 171-82.

▼**M7**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Electroforeză în gel pe celule unice alcaline: Tehnică sensibilă pentru detectarea lezării primare a ADN-ului la nivelul celulelor individuale/nucleului.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Cometă: Forma pe care o adoptă nucleoizii după ce au fost supuși unui câmp electroforetic, datorită asemănării acestora cu cometele: capul este nucleul, iar coada este formată de ADN-ul care migrează din nucleu în câmpul electric.

O variabilă/parametru esențial: Aceasta este o variabilă de protocol pentru care o schimbare mică poate avea un impact mare la finalizarea testului. Variabilele esențiale pot fi specifice în funcție de țesut. Variabilele critice nu se modifică, în special în cadrul unui test, fără a lua în considerare modul în care modificarea va afecta răspunsul unui test, de exemplu astfel cum este indicat de amploarea și variabilitatea în martorii pozitivi și negativi. Raportul de testare enumeră modificările variabilelor esențiale efectuate în timpul testului sau în comparație cu protocolul standard de laborator și furnizează o justificare pentru fiecare modificare.

Intensitatea la coadă sau % de ADN la coadă: Aceasta corespunde intensității cozii cometei în raport cu intensitatea totală (cap și coadă). Aceasta reflectă cantitatea de întreruperi ale ADN-ului, exprimată ca procent.

Substanță chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼M7

Apendicele 2

MODELUL FACTORIAL PENTRU IDENTIFICAREA DIFERENȚELOR ÎNTRE SEXE ÎN TESTUL COMET *IN VIVO*

Modelul factorial și analiza acestuia

În acest model, se testează un minim de 5 masculi și 5 femele la fiecare nivel de concentrație, rezultând un model de testare care utilizează un minim de 40 de animale (20 de masculi și 20 de femele, plus martori pozitivi relevanți).

Modelul, care este unul dintre cele mai simple modele factoriale, este echivalent cu o analiză bidirecțională a variației, având ca efecte principale sexul și nivelul de concentrație. Datele pot fi analizate utilizând numeroase pachete software standard pentru statistici cum ar fi SPSS, SAS, STATA, Genstat, precum și utilizând R.

Analiza împarte variabilitatea în setul de date în cea dintre sexe, cea dintre concentrații și cea referitoare la interacțiunea dintre sexe și concentrații. Se testează fiecare dintre termeni în raport cu o estimare a variabilității între animalele replică în cadrul grupurilor de animale de același sex la aceeași concentrație. Detalii complete privind metodologia de bază sunt disponibile în numeroase manuale statistice standard (a se vedea referințele) și în secțiunea „Ajutor” pusă la dispoziție odată cu pachetele statistice.

Analiza se desfășoară prin inspectarea condiției de interacțiune a sex x concentrație în tabelul ANOVA ([1]). În absența unei durate semnificative de interacțiune, valorile combinate între sexe sau valorile combinate între nivelurile de concentrație furnizează teste statistice valabile între niveluri pe baza duratei de variabilitate reunite în cadrul grupului.

Analiza continuă prin divizarea estimării variabilității dintre concentrații în contraste care furnizează un test de contraste lineare și pătratice ale răspunsurilor între nivelurile de concentrație. În cazul în care există o interacțiune semnificativă sex x concentrație, această condiție poate fi divizată, de asemenea, în contraste de interacțiune liniară a sexului x și contraste de interacțiune pătratică a sexului x. Aceste condiții furnizează teste ale faptului dacă răspunsurile de concentrație sunt paralele pentru cele două sexe sau există un răspuns diferențiat între cele două sexe.

Estimarea variabilității reunite în cadrul grupului poate fi utilizată pentru a furniza teste pe perechi cu privire la diferența dintre valorile medii. Aceste comparații ar putea fi efectuate între valorile medii pentru cele două sexe și între valorile medii pentru nivelurile diferite de concentrație, precum cele pentru comparații cu nivelurile de martori negativi. În cazurile în care există o interacțiune semnificativă, se pot efectua comparații între valorile medii de concentrații diferite pentru un sex sau între valorile medii ale sexelor la aceeași concentrație.

Referințe

Există numeroase manuale statistice care tratează teoria, conceperea, metodologia, analiza și interpretarea modelelor factoriale, variind de la analizele cele mai simple cu doi factori la forme mai complexe utilizate în metodologia de concepere a experimentelor. Lista de mai jos este o listă neexhaustivă. Unele cărți oferă exemple concrete de modele de testare comparabile, în unele cazuri cu codul pentru efectuarea analizelor utilizând diferite pachete software.

([1]) Statisticienii care adoptă o abordare bazată pe modelare, precum utilizarea modelelor liniare generalizate (GLM) pot aborda analiza într-o manieră diferită, dar comparabilă, dar acest lucru nu va deriva în mod necesar din tabelul ANOVA tradițional, care datează de la abordările algoritmice pentru calculul statisticilor dezvoltate în epoca de dinaintea computerului.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Apendicele 3

LIMITĂRI ACTUALE ALE TESTULUI

Datorită stadiului actual al cunoștințelor, mai multe limitări sunt asociate cu testul Comet *in vivo*. Se preconizează că aceste limitări vor fi reduse sau delimitate mai precis, întrucât s-a dobândit mai multă experiență în aplicarea testului pentru a răspunde problemelor de siguranță într-un context normativ.

1. Unele tipuri de leziuni ale ADN-ului pot fi de scurtă durată, și anume pot fi reparate prea repede pentru a fi observate în 24 ore sau mai mult de la ultima administrare. Nu se poate identifica o lista a tipurilor de leziuni de scurtă durată, nici a substanțelor chimice care sunt susceptibile să producă acest tip de lezare, nici nu se cunoaște după ce perioadă de timp poate fi detectat acest tip de lezare. Momentul (momentele) optim(e) de prelevare poate (pot) fi specific(e), de asemenea, substanței chimice sau căii de administrare și momentele de prelevare se determină pe baza datelor cinetice (de exemplu, timpul T_{max} la care se atinge concentrația de vârf în plasmă sau țesut), atunci când aceste date sunt disponibile. Majoritatea studiilor de validare care sprijină această metodă de testare au specificat necropsia în 2 sau 3 ore de la administrarea dozei finale. Majoritatea studiilor din literatura de specialitate descriu administrarea dozei finale între 2 și 6 ore înainte de sacrificare. Prin urmare, aceste experiențe au fost utilizate ca bază pentru recomandarea în cadrul metodei de testare conform căreia, în lipsa unor date care să indice contrariul, se administrează doza finală la un anumit timp specific între 2 și 6 ore înainte de necropsie.

2. Nu există date de studiu identificabile care să examineze sensibilitatea testului pentru detectarea leziunilor ADN-ului de scurtă durată în urma administrării în hrana sau în apa de băut în comparație cu administrarea prin gavaj. Lezarea ADN-ului a fost detectată în urma administrării în hrana animalelor și în apa de băut, dar există relativ puține astfel de rapoarte în comparație cu experiența mult mai vastă cu gavajul și administrarea i.p. Prin urmare, sensibilitatea testului poate fi redusă pentru substanțele chimice care induc leziuni cu durată scurtă de viață administrate prin hrană sau apa de băut.

3. Nu au fost efectuate studii interlaboratoare în țesuturi, altele decât ficat și stomac, prin urmare, nu au fost stabilite recomandări pentru modul în care se poate obține un răspuns sensibil și reproductibil în țesuturi altele decât ficatul, cum ar fi plaje de valori preconizate ale martorilor pozitivi și negativi. De asemenea, pentru ficat, nu s-a ajuns la un acord privind stabilirea unei limite inferioare pentru valoarea martorului negativ.

4. Cu toate că există mai multe publicații care demonstrează efectul de confuzie al citotoxicității *in vitro*, au fost publicate foarte puține date *in vivo* și, prin urmare, nu a fost recomandată nicio măsură unică de citotoxicitate. Modificările histopatologice precum inflamarea, infiltrația celulară, modificările apoptotice sau necrotice au fost asociate cu creșteri ale migrației ADN-ului, cu toate că, astfel cum s-a demonstrat prin studiul de validare JaCVAM (OCDE, 2014), aceste modificări nu au întotdeauna ca efect constatări Comet pozitive și, prin urmare, nu este disponibilă nicio lista definitivă a modificărilor histopatologice care sunt asociate întotdeauna cu creșterea migrației ADN-ului. Celulele arici (sau nori, celule fantome) au fost sugerate anterior ca un indicator de citotoxicitate, însă etiologia celulelor arici este incertă. Există date care sugerează faptul că acestea pot fi cauzate de citotoxicitatea dată de substanța chimică, lezarea indusă mecanic/enzimatic în cursul preparării probei (Guerard *et al.,* 2014) și/sau un efect la niveluri extreme de genotoxicitate a substanței chimice de testat. Alte date par să demonstreze că acestea se datorează lezării extensive, dar probabil reparabile a ADN-ului (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼**M7**

5. Țesuturile sau nuclee celulare au fost înghețate cu succes pentru a fi analizate mai târziu. În mod normal, acest lucru conduce la un efect măsurabil asupra răspunsului la vehiculul și martorul pozitiv (Recio *et al.,* 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). În cazul în care se utilizează înghețarea, laboratorul trebuie să demonstreze competență în metodologiile de înghețare și să confirme plaje de valori scăzute acceptabile de % de ADN la coadă în țesuturile țintă ale animalelor tratate cu vehicul și faptul că răspunsuri pozitive pot fi încă detectate. În referințele bibliografice, înghețarea țesuturilor a fost descrisă utilizând diferite metode. Cu toate acestea, în prezent, nu există niciun acord cu privire la cele mai bune modalități de a îngheța și a dezgheța țesuturi, precum și la modul în care se evaluează dacă un eventual răspuns modificat poate afecta sensibilitatea testului.

6. Lucrările recente demonstrează că lista variabilelor esențiale se preconizează să devină mai scurtă în continuare și parametrii pentru variabilele esențiale, mai precis definiți (Guerard *et al.*, 2014).

Referințe

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, p. 11421.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, p. 699-707.

(3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,*Mutagenesis*, Vol. 28/4, p. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.*35:14962.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, p. 101-13.

▼**M8**

B.63. TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 421 (2016). Orientările OCDE pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic în contextul evoluțiilor științifice. Orientarea inițială nr. 421 privind testarea pentru depistare a fost adoptată în 1995, pe baza unui protocol pentru un „Test preliminar de depistare a toxicității pentru reproducere” discutat în cadrul a două reuniuni ale experților, la Londra, în 1990 (1) și la Tokyo în 1992 (2).

2. Această metodă de testare a fost actualizată cu puncte finale relevante privind perturbatorii endocrini, ca o continuare a activității cu prioritate ridicată inițiată de OCDE în 1998 în vederea revizuirii orientărilor existente privind testarea și a elaborării unor noi orientări privind testarea pentru depistarea și testarea unor potențiali perturbatori endocrini (3). Orientarea nr. 407 a OCDE privind testarea (studiul de toxicitate orală cu doză repetată la rozătoare, de 28 de zile, capitolul B.7 din prezenta anexă), de exemplu, a fost îmbunătățită în 2008 cu parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice de testat. În cadrul actualizării Orientării nr. 421 privind testarea, obiectivul a fost acela de a include câteva puncte finale relevante pentru perturbatori endocrini în orientările privind testele pentru depistare în cazul în care perioadele de expunere acoperă unele dintre perioadele sensibile din procesul de dezvoltare (perioadele prenatale sau postnatale timpurii).

3. Punctele finale relevante suplimentare selectate pentru perturbatorii endocrini fac parte, de asemenea, din TG nr. 443 privind testarea (Studiu extins de toxicitate pentru reproducere la o singură generație, capitolul B.56 din prezenta anexă) au fost incluse în TG nr. 421 pe baza unui studiu de fezabilitate care abordează aspecte științifice și tehnice legate de includerea acestora, precum și de posibile adaptări ale modelului testului, care sunt necesare pentru includerea acestora (4).

4. Această metodă de testare este concepută pentru a genera informații limitate cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra performanței reproductive a masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadelor, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția. Aceasta nu este o alternativă la metodele de testare existente B.31, B.34, B.35 sau B.56 și nici nu le înlocuiește.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Această metodă de testare pentru depistare poate fi utilizată pentru a furniza informații inițiale cu privire la posibile efecte asupra reproducerii și/sau dezvoltării, fie într-un stadiu incipient de evaluare a proprietăților toxicologice ale substanțelor chimice, fie asupra substanțelor chimice de interes. Aceasta poate fi utilizată, de asemenea, în cadrul unui set de teste inițiale pentru depistare în cazul substanțelor chimice existente pentru care sunt disponibile informații toxicologice puține sau pentru care nu sunt disponibile astfel de informații, ca un studiu pentru stabilirea intervalului de dozare pentru studii mai ample privind reproducerea/dezvoltarea sau pentru alte cazuri considerate relevante. În desfășurarea studiului, ar trebui să se respecte principiile directoare și considerentele prezentate în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (5).

▼**M8**

6. Această metodă de testare nu oferă informații complete cu privire la toate aspectele legate de reproducere și dezvoltare. În special, aceasta oferă doar mijloace limitate de detectare a manifestărilor postnatale ale expunerii prenatale sau a efectelor care pot fi induse în timpul expunerii postnatale. Printre altele, din cauza numărului relativ mic de animale din grupurile de dozare, a selectivității punctelor finale și a duratei scurte a studiului, această metodă nu va furniza dovezi pentru concluzii sigure privind inexistența efectelor. În plus, în absența datelor provenite din alte teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare.

7. Rezultatele obținute prin parametrii endocrini conecși ar trebui să fie evaluate în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine” (6). În acest cadru conceptual, orientarea nr. 421 a OCDE privind testarea îmbunătățită se regăsește la nivelul 4 ca test *in vivo* care asigură date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante ale sistemului endocrin. Însă este posibil ca un semnal endocrin să nu fie considerat drept o dovadă suficientă în sine pentru faptul că substanța chimică de testat este un perturbator endocrin.

8. Această metodă de testare presupune administrarea substanței chimice de testat pe cale orală. Dacă se utilizează alte căi de expunere, este posibil să fie necesare modificări.

9. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

10. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Substanța chimică de testat se administrează în doze gradate mai multor grupuri de masculi și femele. Doza pentru masculi ar trebui să fie administrată pentru o perioadă de cel puțin patru săptămâni și până în ziua dinaintea sacrificării planificate inclusiv (aceasta include cel puțin două săptămâni înainte de împerechere, perioada de împerechere și aproximativ două săptămâni după împerechere). Având în vedere perioada de dozare limitată de pre-împerechere a masculilor, este posibil ca fertilitatea să nu fie un indicator deosebit de sensibil al toxicității testiculare. Prin urmare, este esențială o examinare histologică detaliată a testiculelor. Combinația dintre o perioadă de dozare de pre-împerechere de două săptămâni și de formulare ulterioară a observațiilor privind împerecherea/fertilitatea și o perioadă de dozare generală de cel puțin patru săptămâni, urmată de histopatologia detaliată a gonadelor de sex masculin, este considerată suficientă pentru a permite detectarea majorității efectelor asupra fertilității masculine și a spermatogenezei.

12. Femelelor ar trebui să li se administreze doze pe toată durata studiului. Aceasta include două săptămâni înainte de împerechere (cu obiectivul de a acoperi cel puțin două cicluri estrale complete), timpul variabil până la concepție, durata sarcinii și cel puțin 13 zile după parturiție, până în ziua dinaintea eutanasierii planificate inclusiv.

13. Durata studiului, în urma aclimatizării și evaluării ciclului estral înainte de dozare, depinde de performanța femelei și este de aproximativ 63 de zile, [cel puțin 14 zile înainte de împerechere, (până la) 14 zile de împerechere, 22 de zile de gestație, 13 zile de lactație].

▼M8

14. În perioada de administrare, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea identificării unor eventuale semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în perioada de testare sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate.

DESCRIEREA METODEI

Selecția speciilor de animale

15. Această metodă de testare este concepută pentru a fi utilizată la șobolan. În cazul în care parametrii specificați în cadrul acestei metode de testare sunt investigați la o altă specie de rozătoare, ar trebui să se prezinte o justificare detaliată. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea perturbatorilor endocrini în TG nr. 407 din OCDE (care corespunde capitolului B.7 din prezenta anexă), șobolanul a fost singura specie folosită. Nu ar trebui să se utilizeze sușe cu fecunditate scăzută sau cu o incidență a defectelor de dezvoltare cunoscută a fi ridicată. Ar trebui să se folosească animale virgine sănătoase, care nu au fost supuse anterior unor proceduri experimentale. Animalele de experiență ar trebui să fie caracterizate în ceea ce privește specia, sușa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite ar trebui să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex. În cazul în care studiul este realizat cu titlu de studiu preliminar pentru un studiu pe termen lung sau pentru o întreagă generație, este de preferat să se utilizeze, în ambele studii, animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

Adăpostire și hrănire

16. Toate procedurile ar trebui să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. Temperatura camerei în care se află animalele de experiență ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °). Cu toate că umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și, de preferință, să nu depășească 70 % decât în timpul operațiunilor de curățare a sălii, obiectivul de umiditate este de 50-60 %. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe chimice de testat atunci când aceasta se administrează utilizând această metodă.

17. Animalele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu ar trebui să se depășească numărul de cinci animale în fiecare cușcă. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Femelele gestante ar trebui să fie plasate în cuști individuale și prevăzute cu materiale pentru cuibărire. Femelele aflate în lactație vor fi plasate în cuști individuale împreună cu progeniturile acestora.

18. Hrana ar trebui să fie analizată în mod regulat în vederea identificării contaminanților. Ar trebui să se rețină un eșantion din hrană până la finalizarea raportului.

Pregătirea animalelor

19. Animale adulte, tinere și sănătoase sunt distribuite în mod aleatoriu în grupuri martor și grupuri de tratament. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate amplasării cuștii. Animalele prezintă o identificare unică și sunt ținute în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

Prepararea dozelor

20. Se recomandă administrarea orală a substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care se consideră că sunt adecvate alte căi de administrare. Atunci când se alege calea orală, substanța chimică de testat se administrează, de obicei, prin gavaj; însă, în mod alternativ, substanțele chimice de testat pot fi administrate împreună cu hrana sau cu apa potabilă.

▼M8

21. Dacă este necesar, substanța chimică de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se ia în considerare în primul rând utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/emulsii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și ulterior a unei soluții posibile în alte vehicule. Pentru alte vehicule decât apa, ar trebui să fie cunoscute caracteristicile toxice ale vehiculului respectiv. Ar trebui să se determine stabilitatea și omogenitatea substanței chimice de testat în vehicul.

PROCEDURA

Numărul și sexul animalelor

22. Se recomandă ca, la început, fiecare grup să aibă cel puțin 10 masculi și 12-13 femele. Femelele vor fi evaluate înainte de expunere pentru ciclicitatea estrală, iar animalele la care nu se produc cicluri tipice de 4-5 zile nu vor fi incluse în studiu; prin urmare, se recomandă femele suplimentare pentru a obține 10 femele într-un grup. Cu excepția cazului în care apar efecte toxice pronunțate, se preconizează că acesta va asigura cel puțin 8 femele gestante în fiecare grup, care reprezintă, în mod normal, numărul minim acceptabil de femele gestante într-un grup. Obiectivul este să se asigure un număr suficient de sarcini și pui pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de testat de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern și de supt, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F_1, de la concepție până în ziua 13 a perioadei post-partum.

Dozare

23. În general, ar trebui să se utilizeze cel puțin trei grupuri de testare tratate și un grup martor. Nivelurile de dozare pot fi stabilite în funcție de informațiile obținute în urma testelor de toxicitate acută sau de rezultatele studiilor cu doze repetate. Cu excepția tratării cu substanța chimică de testat, animalele din grupul martor ar trebui să fie tratate în mod identic cu animalele din grupul de testare. Dacă pentru administrarea substanței chimice de testat se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.

24. Dozele ar trebui să fie selectate ținându-se cont de toxicitatea existentă și de datele toxico-cinetice disponibile. De asemenea, ar trebui să se țină seama de faptul că ar putea exista diferențe de sensibilitate între animalele gestante și cele negestante. Ar trebui să fie aleasă doza cea mai mare pentru a induce efecte toxice, însă nu moartea sau suferințe grave. În continuare, ar trebui să se scadă nivelul dozelor pentru a se pune în evidență un eventual răspuns legat de doză și concluzia că nu există efecte adverse observate (NOAEL) la cel mai redus nivel al dozei. Intervalul optim pentru determinarea nivelurilor descrescătoare ale dozelor este frecvent un factor de doi sau patru și, deseori, este de preferat să se adauge un al patrulea grup de testare, în loc să se utilizeze intervale foarte mari (de exemplu, un factor mai mare de 10) între doze.

25. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau a altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra punctelor finale endocrine sensibile ar trebui să fie interpretate cu precauție.

Testul valorilor-limită

26. Dacă un studiu oral efectuat la un dozaj de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării împreună cu hrana sau cu apă potabilă, într-un procent echivalent în hrană sau în apa potabilă, folosind procedurile descrise pentru acest studiu, nu produce efecte toxice detectabile și dacă nu se anticipează toxicitatea pe baza datelor despre substanțe cu structuri asemănătoare, atunci este posibil să nu fie considerată necesară realizarea unui studiu complet cu mai multe niveluri de dozare. Testul valorilor-limită este valabil, cu excepția cazului în care expunerea umană indică faptul că trebuie să se administreze o doză mai mare pe cale orală. Pentru alte tipuri de administrare, cum sunt inhalarea sau aplicarea dermică, este posibil ca proprietățile fizice și chimice ale substanțelor chimice de testat să determine deseori nivelul maxim posibil al concentrației.

▼M8

Administrarea dozelor

27. Animalelor li se administrează substanța chimică de testat zilnic, timp de 7 zile pe săptămână. Când substanța chimică de testat este administrată prin gavaj, administrarea ar trebui să fie în doză unică la animale, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. Volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor chimice de testat iritante sau corozive care vor produc, de regulă, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.

28. Pentru substanțele chimice de testat administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță chimică de testat implicate nu influențează nutriția normală sau echilibrul hidric. Dacă substanța chimică de testat se administrează în hrană, aceasta poate fi administrată fie într-o concentrație constantă în alimentație (ppm), fie la o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor; alternativa utilizată ar trebui precizată. În cazul unei substanțe chimice de testat administrate prin gavaj, doza ar trebui să se administreze la aproximativ aceeași oră în fiecare zi și să fie ajustată cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant al dozei în funcție de greutatea corporală a animalului.

Schema de tratament

29. Administrarea dozelor la ambele sexe ar trebui să înceapă cu cel puțin 2 săptămâni înainte de împerechere, după ce acestea au fost aclimatizate timp de cel puțin cinci zile, iar femelele au fost supuse unui control privind ciclurile estrale normale (într-o perioadă de pre-tratament de 2 săptămâni). Studiul ar trebui să fie planificat în așa fel încât evaluarea ciclului estral să înceapă de îndată ce animalele au ajuns la maturitatea sexuală deplină. Aceasta ar putea varia ușor între diferite sușe de șobolani din diferite laboratoare, de exemplu, la șobolanii Sprague Dawley aceasta este la vârsta de 10 săptămâni, la șobolanii Wistar la vârsta de aproximativ 12 săptămâni. Femelele cu pui ar trebui să fie eutanasiate în ziua 13 post-partum sau imediat după aceea. Ziua nașterii (și anume, atunci când s-a încheiat parturiția) este definită ca fiind ziua 0 post-partum. Femelele care nu prezintă semne ale copulației sunt eutanasiate după 24-26 zile de la ultima zi a perioadei de împerechere. Administrarea dozelor continuă la ambele sexe în perioada de împerechere. Masculilor ar trebui să li se administreze în continuare doze după perioada de împerechere cel puțin până la încheierea perioadei de dozare minime totale de 28 de zile. Apoi aceștia sunt eutanasiați sau, alternativ, sunt reținuți pentru administrarea în continuare a dozelor pentru o posibilă desfășurare a unei a doua împerecheri, dacă se consideră că este cazul.

30. Administrarea de doze zilnice la femelele parentale ar trebui să continue pe întreaga durată a sarcinii și cel puțin până în ziua 13 post-partum inclusiv sau cu o zi înainte de sacrificare. În cazul studiilor în care substanța chimică de testat se administrează prin inhalare sau subcutanat, dozele ar trebui să fie administrate în continuare cel puțin până în ziua 19 de sarcină inclusiv și administrate din nou cât mai curând posibil, dar nu mai târziu de ziua post-fătare (PND) 4.

31. În apendicele 2 este prezentată o diagramă a schemei de tratament.

Procedura de împerechere

32. De regulă, în prezentul studiu ar trebui utilizate împerecheri 1:1 (un mascul la o femelă). Pot exista excepții în cazul deceselor ocazionale ale masculilor. Femela ar trebui să fie plasată împreună cu același mascul până când se observă semne ale copulației sau au trecut două săptămâni. În fiecare dimineață, femelele ar trebui să fie examinate pentru a se constata prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se constată existența unui dop vaginal sau a spermei). În cazul în care împerecherea eșuează, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculi din același grup care și-au dovedit capacitatea reproductivă.

▼M8

Dimensiunea seriei de pui

33. În ziua 4 de după naștere, dimensiunea fiecărei serii de pui poate fi ajustată prin eliminarea puilor suplimentari printr-o selecție aleatorie pentru a obține, pe cât posibil, patru sau cinci pui per sex per serie, în funcție de dimensiunea normală a seriei la sușa de șobolani utilizați. Ar trebui să se colecteze probe de sânge de la doi dintre puii în exces, care să fie grupate și utilizate pentru determinarea nivelurilor serului T4. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu pe baza greutății corporale sau a distanței anogenitale (AGD) nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de patru sau cinci exemplare din fiecare sex per serie, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele). Nu se vor elimina pui dacă dimensiunea seriei va scădea sub ținta de sacrificare (8 sau 10 de pui/serie). Dacă există un singur pui peste obiectivul de sacrificare, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

34. Dacă dimensiunea seriei nu este ajustată, se sacrifică doi pui per serie în ziua 4, după naștere, și se iau probe de sânge pentru măsurarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni din ser. Dacă este posibil, cei doi pui per serie ar trebui să fie pui de sex feminin pentru a rezerva puii masculi în vederea evaluării retenției mamelonului, cu excepția cazului în care în urma îndepărtării puilor respectivi nu mai rămân femele pentru evaluare la încheierea procesului. Nu se vor elimina pui în cazul în care dimensiunea seriei va scădea sub 8 sau 10 pui/serie (în funcție de dimensiunea normală a seriei în sușa de șobolani utilizată). Dacă există un singur pui peste dimensiunea normală a seriei, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

Observații în-viață

Observații clinice

35. Pe parcursul întregii perioade de testare, ar trebui să se formuleze observații clinice generale cel puțin o dată pe zi și mai frecvent atunci când se observă semne de toxicitate. Acestea ar trebui să fie efectuate, de preferat, la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrarea dozelor. Ar trebui să se înregistreze modificări comportamentale semnificative, semnele unei parturiții dificile sau prelungite și toate semnele de toxicitate, inclusiv mortalitatea. Aceste evidențe ar trebui să includă momentul apariției, gradul și durata semnelor de toxicitate.

Greutate corporală și consumul de hrană/apă

36. Masculii și femelele ar trebui să fie cântărite în prima zi a administrării dozelor, apoi cel puțin săptămânal și la sfârșit. În timpul sarcinii, femelele ar trebui să fie cântărite în zilele 0, 7, 14 și 20 și în termen de 24 de ore de la parturiție (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Aceste observații ar trebui să fie consemnate individual pentru fiecare animal adult.

37. În perioada de pre-împerechere, de sarcină și de alăptare, consumul de alimente ar trebui să fie măsurat cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană în timpul împerecherii este opțională. Pe parcursul acestor perioade, consumul de apă ar trebui, de asemenea, să fie măsurat atunci când substanța chimică de testat este administrată împreună cu apa potabilă.

Cicluri estrale

38. Înainte de a începe tratamentul, ar trebui să se monitorizeze ciclurile estrale pentru femelele studiate cu ciclicitate regulate (a se vedea punctul 22). De asemenea, frotiul vaginal ar trebui să fie monitorizat zilnic de la începutul perioadei de tratament, până la obținerea dovezii împerecherii. În cazul în care există motive de îngrijorare cu privire la efecte de criză acută care ar

▼M8

putea modifica ciclurile estrale odată cu inițierea administrării dozelor, laboratoarele pot să expună animalele de experiență timp de două săptămâni, apoi să colecteze frotiuri vaginale zilnic pentru a monitoriza ciclul estral timp de cel puțin două săptămâni în perioada de pre-împerechere, cu o continuare a monitorizării în perioada de împerechere până când există dovezi ale împerecherii. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, ar trebui să se evite orice perturbare a mucoasei, care ar putea induce pseudogestația (7) (8).

Parametrii puilor

39. Durata gestației ar trebui să fie înregistrată, calculându-se din ziua 0 de gestație. Fiecare serie de pui ar trebui să fie examinată cât mai curând posibil după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, puii subdezvoltați (puii care sunt semnificativ mai mici decât puii corespunzători din grupul martor) și prezența unor anomalii macroscopice.

40. În termen de 24 de ore de la parturiție, puii vii ar trebui să fie numărați și separați pe sexe, iar seriile de pui cântărite (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Pe lângă observațiile descrise la punctul 35, ar trebui să fie consemnat orice comportament anormal al puiului.

41. Este necesar ca AGD a fiecărui pui să fie măsurată în aceeași zi post-natală de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor ar trebui să fie consemnează în ziua în care se măsoară AGD, aceasta trebuind să fie normalizată la o valoare aferentă dimensiunii puiului, de preferat, rădăcina cubică a greutății corporale (9). Numărul sfârcurilor/aureolelor la puii masculi ar trebui să fie calculat în PND 12 sau 13, astfel cum se recomandă în Orientarea nr. 151 a OCDE (10).

Biochimia clinică

42. Sunt prelevate probe de sânge dintr-un anumit loc pe baza următorului calendar:

— de la cel puțin doi pui pe serie în ziua 4, după naștere, în cazul în care numărul puilor permite acest lucru (a se vedea punctele 33-34)

— de la toate femelele și de la cel puțin doi pui pe serie la încheiere, în ziua 13, și

— de la toți masculii adulți, la încheiere,

Toate probele de sânge sunt păstrate în condiții adecvate. Sunt analizate probe de sânge de la pui din ziua 13 și de la masculii adulți pentru identificarea nivelurilor de hormoni tiroidieni din ser (T4). Dacă se consideră că este relevant, sunt efectuate analize suplimentare ale T4 din probele de sânge de la femele și de la puii din ziua 4. Opțional, dacă se consideră relevant, ar putea fi măsurați și alți hormoni. Probele de sânge ale puilor pot fi grupate pe serii pentru analize ale hormonilor tiroidieni. Hormonii tiroidieni (T4 și TSH) ar trebui, de preferință, să fie măsurați ca „valoare totală”.

43. Următorii factori pot influența variabilitatea și concentrațiile absolute ale valorilor hormonale determinate:

— momentul eutanasierii, din cauza variației diurne a concentrațiilor hormonale

— metoda de eutanasiere pentru a evita stresul nejustificat exercitat asupra animalelor, care poate afecta concentrațiile hormonale;

— seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot varia prin curbele lor standard.

▼M8

44. Probele de plasmă prevăzute în mod specific pentru determinarea hormonală ar trebui să fie obținute la momente comparabile din zi. Valorile numerice obținute la analiza concentrațiilor hormonale diferă în funcție de diferitele seturi de testare comerciale.

Patologie

Autopsie macroscopică

45. La momentul sacrificării sau al decesului pe durata studiului, animalele adulte ar trebui să fie examinate macroscopic pentru determinarea oricăror anomalii sau modificări patologice. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Ar trebui să se înregistreze numărul de locuri de implantare. Ar trebui să se examineze frotiurile vaginale în dimineața zilei autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu histopatologia ovarelor.

46. Testiculele și epididimitele, precum și prostata și veziculele seminale cu glande coagulante în ansamblu, ale tuturor masculilor adulți ar trebui să fie curățate de țesuturile aderente, după caz, și greutatea umedă a acestora înregistrată cât mai curând posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În plus, greutățile opționale ale organelor ar putea include complexul muscular levatorul ani plus bulbocavernos, glandele Cowper și glandul penisului la masculi și ovarele (greutate umedă) cuplate cu uterul (inclusiv colul uterin) la femele; dacă sunt incluse, aceste greutăți ar trebui să fie colectate cât mai curând posibil după disecție.

47. Puii morți și puii eutanasiați în ziua 13 post-partum, sau imediat după aceea, ar trebui să fie cel puțin examinați cu atenție la exterior pentru identificarea anomaliilor macroscopice. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită organelor genitale de reproducere externe, care ar trebui să fie examinate pentru identificarea unor modificări în dezvoltare. În ziua 13, ar trebui să fie păstrată tiroida de la un mascul pui și o femelă pui per serie.

48. Ar trebui să se păstreze ovarele, testiculele, organele sexuale anexe (uter și col uterin, epididimite, prostată, vezicule seminale plus glande coagulante), tiroida și toate organele care prezintă leziuni macroscopice la toate animalele adulte. Fixarea formaldehidei nu este recomandată în cazul examinării de rutină a testiculelor și a epididimitelor. O metodă acceptabilă este utilizarea fixatorului Bouin sau Davidson modificat pentru aceste țesuturi (11). Tunica albuginea ar putea fi perforată ușor și superficial cu un ac la ambii poli ai organului pentru a permite pătrunderea rapidă a fixatorului.

Histopatologie

49. Ar trebui să se efectueze un examen histologic detaliat al ovarelor, testiculelor și epididimitelor (se pune un accent deosebit pe fazele spermatogenezei și pe histopatologia structurii celulare testiculare interstițiale) a animalelor din grupul tratat cu doza maximă și din grupul martor. Ar putea fi examinate și celelalte organe păstrate, inclusiv tiroida de la pui și animalele adulte, dacă este necesar. După fixare ar putea fi determinată greutatea tiroidei. Curățarea ar trebui să fie făcută, de asemenea, foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor ar putea compromite analiza histopatologică. Examinările ar trebui să fie extinse la animalele din grupurile tratate cu alte doze, atunci când se constată modificări în grupul tratat cu doza cea mai mare. Ghidul privind histopatologia (11) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și histopatologia țesuturilor endocrine.

▼M8

DATE ȘI RAPORTARE

Date

50. Ar trebui să fie furnizate date despre fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate în format tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de testare, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind seriile. În apendicele 3 este prezentat un format tabelar de raport de sinteză care s-a dovedit a fi foarte util pentru evaluarea efectului privind reproducerea/dezvoltarea.

51. Din cauza dimensiunilor limitate ale studiului, analizele statistice sub formă de teste de „semnificație” au o valoare limitată pentru multe puncte finale, în special punctele finale privind reproducerea. În cazul în care se utilizează analize statistice, atunci metoda aleasă ar trebui să fie adecvată pentru distribuirea variabilei examinate și să fie aleasă înainte de începerea studiului. Analiza statistică a AGD și a retenției sfârcurilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luate în considerare efectele asupra seriei. Dacă este cazul, seria constituie unitatea de analiză. Analiza statistică a greutății corporale a puilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luată în considerare dimensiunea seriei. Din cauza dimensiunii reduse a grupului, utilizarea datelor anterioare privind martorii (de exemplu, pentru dimensiunea seriei), dacă există, ar putea, de asemenea, să ajute la interpretarea studiului.

Evaluarea rezultatelor

52. Constatările acestui studiu de toxicitate ar trebui să fie evaluate sub aspectul efectelor observate, al autopsiei și al constatărilor microscopice. Evaluarea va include relația dintre doza de substanță chimică de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra performanței de reproducere și a seriei, modificări ale greutății corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice.

53. Din cauza perioadei scurte de tratament a masculului, histopatologia testiculelor și a epididimitelor ar trebui luată în considerare împreună cu datele privind fertilitatea la evaluarea efectelor de reproducere la masculi. Utilizarea datelor istorice privind martorii cu privire la reproducere/dezvoltare (de exemplu, pentru dimensiunea seriei, AGD, retenția sfârcurilor, nivelurile T4 din ser), dacă există, ar putea fi utile, de asemenea, pentru interpretarea studiului.

54. Pentru controlul calității, se propune colectarea datelor anterioare privind martorii și calcularea coeficienților de variație pentru datele numerice, în special pentru parametrii corelați cu detectarea perturbatorilor endocrini. Aceste date pot fi folosite în scop de comparație la evaluarea studiilor curente.

Raportul testului

55. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

▼**M8**

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB-uri și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului dacă este altul decât apa.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

— justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât șobolanul

Condiții de testare:

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind formularea substanței chimice de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— conversia concentrației substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apa potabilă în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descriere detaliată a procedurii de randomizare pentru selecția puilor pentru sacrificare, dacă aceștia sunt sacrificați.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— date privind răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și orice alte semne de toxicitate;

— durata gestației;

— efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, puilor, creșterii postnatale etc.;

— natura, gravitatea și durata observațiilor clinice (reversibile sau nu);

— numărul de femele adulte cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;

— numărul de pui născuți vii și de pierderi după implantare;

— date privind greutatea corporală a puilor;

— AGD a tuturor puilor (și greutatea corporală în ziua măsurării AGD)

▼M8

— retenția sfârcurilor la puii masculi;

— nivelurile hormonilor tiroidieni la pui din ziua 13 și masculi adulți (și femele și pui din ziua 4, dacă se măsoară)

— numărul de pui cu anomalii extrem de vizibile, o evaluare brută a organelor genitale externe, numărul de pui subdezvoltați;

— momentul decesului în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— numărul de implantări, dimensiunea seriei și valori ale greutății seriei la momentul înregistrării;

— greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea organelor în cazul animalelor părinți;

— rezultatele autopsiei;

— o descriere detaliată a constatărilor histopatologice;

— date privind absorbția (dacă există);

— tratarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

Interpretarea rezultatelor

56. Studiul va furniza evaluări ale toxicității pentru reproducere/dezvoltare, prin corelare cu administrarea de doze repetate (a se vedea punctele 5 și 6). Acesta ar putea indica dacă este necesar să se efectueze investigații suplimentare și ar putea oferi îndrumări în proiectarea studiilor ulterioare. Ar trebui să se consulte Documentul de orientare nr. 43 al OCDE pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și dezvoltarea (12). Documentul de orientare nr. 106 al OCDE privind evaluarea histologică a testelor endocrine și a testelor de reproducere la rozătoare (11) furnizează informații cu privire la pregătirea și evaluarea organelor (endocrine) și a frotiurilor vaginale care pot fi utile pentru această orientare privind testarea.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27-29 octombrie 1992. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 martie 1998. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 217), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

(6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. și Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, partea B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, în Auston C.R. and Short R.V. (editori), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. și Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 151), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 106), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 43), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII [A SE VEDEA, DE ASEMENEA, ORIENTAREA NR. 150 A OCDE (6)]

Androgenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiandrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiestrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Activitatea antitiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Toxicitate pentru dezvoltare: manifestarea toxicității pentru reproducere, reprezentând afecțiuni prenatale, perinatale, postnatale, structurale sau funcționale ale progeniturii.

Dozarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării dozei.

Doză înseamnă cantitatea de substanță chimică de testat administrată. Doza este exprimată ca greutate a substanței chimice de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

Toxicitatea evidentă este un termen general care descrie semne clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice de testat. Aceste semne ar trebui să fie suficiente pentru a permite o evaluare a pericolelor și ar trebui să fie de așa natură încât o creștere a dozei administrate să poată fi prevăzută a declanșa apariția unor semne de toxicitate severe și probabil moartea.

Afectarea fertilității reprezintă tulburări ale funcțiilor sau capacității de reproducere masculine sau feminine.

Toxicitate maternă: efecte adverse asupra femelelor gestante, care apar fie în mod specific (efect direct), fie în mod nespecific (efect indirect).

NOAEL este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai ridicat nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse din cauza tratamentului.

Estrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Toxicitate pentru reproducere reprezintă efecte dăunătoare asupra descendenților și/sau afectarea funcțiilor sau a capacității de reproducere masculine și feminine.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare.

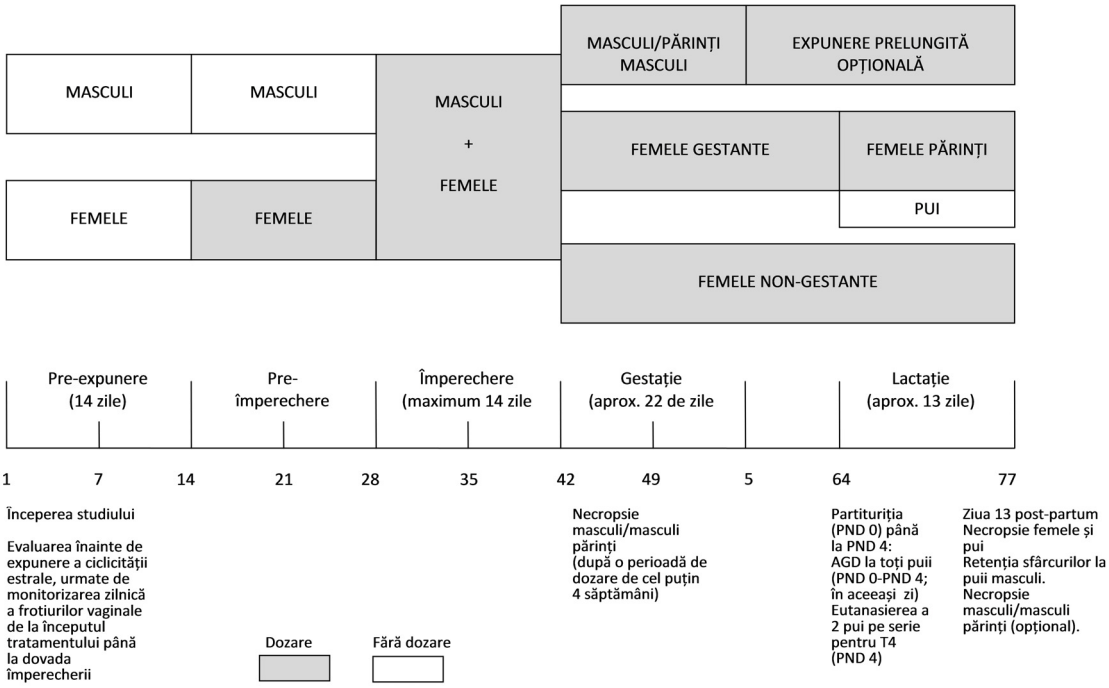
Activitatea tiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

▼**M8**

Apendicele 2

DIAGRAMĂ A SCHEMEI DE TRATAMENT CARE INDICĂ DURATA MAXIMĂ A STUDIULUI, PE BAZA UNEI PERIOADE DE ÎMPERECHERE COMPLETE DE 14 ZILE



▼**M8**

Apendicele 3

RAPORT DE SINTEZĂ TABELAR CU EFECTELE ASUPRA REPRODUCERII/DEZVOLTĂRII

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
Perechi începute (N)					
Ciclul estral (cel puțin durata medie și frecvența ciclurilor neregulate)					
Femele la care apare dovada copulației (N)					
Femele care au ajuns în gestație (N)					
Zile de concepție 1-5 (N)					
Zilele de concepție 6-...([1]) (N)					
Sarcină ≤ 21 de zile (N)					
Sarcină = 22 de zile (N)					
Sarcină ≥ 23 de zile (N)					
Femele cu pui născuți vii (N)					
Femele cu pui născuți vii în ziua 4 pp (N)					
Implanturi/femelă (media)					
Pui vii/femelă la naștere (media)					
Pui vii/femelă în ziua 4 (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) la naștere (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) în ziua 4 (media)					
Greutatea seriei la naștere (media)					
Greutatea seriei în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor la naștere (media)					
Greutatea puilor în momentul măsurării AGD (media la masculi, media la femele)					

▼**M8**

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
AGD a puilor în aceeași zi postnatală, la naștere – ziua 4 (media la masculi, media la femele, se notează PND)					
Greutatea puilor în ziua 4 (media)					
Retenția sfârcurilor la pui masculi în ziua 13 (media)					
Greutatea puilor în ziua 13 (media)					
PUI ANORMALI					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu ≥ 2					
PIERDEREA PUILOR					
Implantații prenatale/postnatale (implantații minus născuți vii)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					
Postnatal (pui născuți vii minus pui vii în ziua postnatală 13)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					

([1]) ultima zi a perioadei de împerechere

▼M8

B.64. **STUDIU DE TOXICITATE CU DOZĂ REPETATĂ COMBINAT CU TESTUL DE DEPISTARE A TOXICITĂȚII PENTRU REPRODUCERE/DEZVOLTARE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 422 (2016). Orientările OCDE pentru testarea substanțelor chimice sunt revizuite periodic în contextul evoluțiilor științifice. Orientarea inițială nr. 422 privind testarea pentru depistare a fost adoptată în 1996, pe baza unui protocol pentru un „Test combinat cu doză repetată și de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare” discutat în cadrul a două reuniuni ale experților, la Londra, în 1990 (1) și la Tokyo în 1992 (2).

2. Această metodă de testare combină o componentă de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare, care se bazează pe experiența dobândită în statele membre ca urmare a utilizării metodei inițiale pe substanțele chimice existente în mare volum de producție și în cadrul unor teste de explorare cu substanțe martor pozitive (3) (4), precum și pe o componentă cu repetarea dozei de toxicitate, în concordanță cu orientarea nr. 407 a OCDE privind testarea (Studiu de toxicitate orală cu doză repetată de 28 de zile la rozătoare, corespunzător capitolului B.7 din prezenta anexă).

3. Această metodă de testare a fost actualizată cu puncte finale relevante privind perturbatorii endocrini, ca o continuare a activității cu prioritate ridicată inițiată de OCDE în 1998 în vederea revizuirii orientărilor existente privind testarea și a elaborării unor noi orientări privind testarea pentru depistarea și testarea unor potențiali perturbatori endocrini (5). În acest context orientarea nr. 407 privind testarea (corespunzătoare capitolului B.7 din prezenta anexă), a fost îmbunătățită în 2008 prin parametri adecvați pentru detectarea activității endocrine a substanțelor chimice de testat. În cadrul actualizării Orientării nr. 422 privind testarea, obiectivul a fost acela de a include câteva puncte finale relevante pentru perturbatori endocrini în orientările privind testele pentru depistare în cazul în care perioadele de expunere acoperă unele dintre perioadele sensibile din procesul de dezvoltare (perioadele prenatale sau postnatale timpurii).

4. Punctele finale relevante suplimentare selectate pentru perturbatorii endocrini fac parte, de asemenea, din TG nr. 443 privind testarea (Studiu extins de toxicitate pentru reproducere la o singură generație, corespunzător capitolului B.56 din prezenta anexă) au fost incluse în TG nr. 422 pe baza unui studiu de fezabilitate care abordează aspecte științifice și tehnice legate de includerea acestora, precum și de posibile adaptări ale modelului testului, care sunt necesare pentru includerea acestora (6).

5. Această metodă de testare este concepută pentru a genera informații limitate cu privire la efectele unei substanțe chimice de testat asupra performanței reproductive a masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadelor, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția. Aceasta nu este o alternativă la metodele de testare existente B.31, B.34, B.35 sau B.56 și nici nu le înlocuiește.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

6. În analiza și evaluarea caracteristicilor toxice ale unei substanțe chimice de testat, determinarea toxicității orale folosind doze repetate se poate realiza după ce au fost obținute informațiile inițiale privind toxicitatea din teste de toxicitate acută. Acest studiu oferă informații cu privire la posibilele pericole pentru sănătate care pot apărea în urma expunerii repetate pe o perioadă de timp relativ limitată. Metoda cuprinde studiul de bază de toxicitate la doză repetată, care se poate folosi pentru substanțe chimice pentru care nu este justificat un studiu de 90 de zile (de exemplu, în cazul în care volumul de producție nu depășește anumite limite) sau ca studiu preliminar în cazul unui studiu pe termen lung. În desfășurarea studiului, ar trebui să se respecte principiile directoare și considerentele prezentate în documentul de orientare nr. 19 al OCDE privind recunoașterea, evaluarea și utilizarea semnelor clinice ca puncte finale fără suferință pentru animalele de experiență utilizate în evaluări ale siguranței (7).

▼**M8**

7. De asemenea, acesta cuprinde un test de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare și, prin urmare, poate fi utilizat, de asemenea, pentru a furniza informații inițiale cu privire la posibile efecte asupra performanțelor de reproducere ale masculilor și femelelor, cum ar fi funcția gonadală, comportamentul de împerechere, concepția, dezvoltarea produsului de concepție și parturiția, fie într-o etapă timpurie de evaluare a proprietăților toxicologice ale substanțelor chimice de testat, fie cu privire la substanțe chimice de testat de interes. Această metodă de testare nu oferă informații complete cu privire la toate aspectele legate de reproducere și dezvoltare. În special, aceasta oferă doar mijloace limitate de detectare a manifestărilor postnatale ale expunerii prenatale sau a efectelor care pot fi induse în timpul expunerii postnatale. Printre altele, din cauza selectivității punctelor finale și a duratei scurte a studiului, această metodă nu va furniza dovezi pentru concluzii sigure privind inexistența efectelor pentru reproducere/dezvoltare. În plus, în absența datelor provenite din alte teste de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare.

8. Rezultatele obținute prin parametrii endocrini conecși ar trebui să fie evaluate în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine” (8). În acest cadru conceptual, orientarea nr. 422 a OCDE privind testarea îmbunătățită se regăsește la nivelul 4 ca test *in vivo* care asigură date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante ale sistemului endocrin. Însă este posibil ca un semnal endocrin să nu fie considerat drept o dovadă suficientă în sine pentru faptul că substanța chimică de testat este un perturbator endocrin.

9. Această metodă de testare pune accentul, de asemenea, pe efectele neurologice ca punct final specific, precum și pe nevoia unor observații clinice riguroase, pentru a se obține cât mai multe informații posibil. Metoda ar trebui să presupună identificarea substanțelor chimice cu potențial neurotoxic, care ar putea justifica desfășurarea în continuare a unor studii mai aprofundate cu privire la acest aspect. În plus, metoda poate oferi, de asemenea, o indicație elementară a efectelor imunologice.

10. În absența datelor provenite din alte studii de toxicitate sistemică, de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, de neurotoxicitate și/sau imunotoxicitate, rezultatele pozitive sunt utile pentru evaluarea inițială a pericolelor și contribuie la luarea deciziilor cu privire la necesitatea și calendarul testelor suplimentare. Testul poate fi deosebit de util ca parte a setului de date cu informații de depistare al OCDE (SIDS) pentru evaluarea substanțelor chimice existente pentru care există puține informații toxicologice sau pentru care nu există astfel de informații, și care poate servi drept alternativă la efectuarea a două teste separate pentru toxicitatea la doze repetate (TG nr. 407 a OCDE, corespunzătoare capitolului B.7 din prezenta anexă) și pentru toxicitate pentru reproducere/dezvoltare (TG nr. 421 a OCDE, corespunzătoare capitolului B.63 din prezenta anexă). Acesta poate fi utilizat, de asemenea, ca studiu pentru stabilirea dozelor pentru studii mai ample privind reproducerea/dezvoltarea sau în alte cazuri considerate relevante.

11. În general, se presupune că există diferențe de sensibilitate între animalele gestante și animalele negestante. Prin urmare, ar putea fi mai complicat să se stabilească niveluri ale dozelor în cadrul acestui test combinat, care să fie adecvate pentru evaluarea toxicității sistemice generale și a toxicității specifice pentru reproducere/dezvoltare, decât în cazul în care sunt efectuate teste individuale separat. În plus, interpretarea rezultatelor testelor în ceea ce privește toxicitatea sistemică generală ar putea fi mai dificilă decât atunci când se realizează un studiu cu doză repetată separat, în special atunci când parametrii serului și ai histopatologiei nu sunt evaluați în același timp în cadrul studiului. Din cauza acestor complicații tehnice, este necesară o

▼M8

experiență considerabilă în ceea ce privește testarea toxicității pentru efectuarea prezentului test combinat de depistare. Pe de altă parte, în afara numărului mai mic de animale implicate, testul combinat poate oferi mijloace mai bune de diferențiere a efectelor directe asupra reproducerii/dezvoltării de cele care sunt secundare altor efecte (sistemice).

12. În cadrul acestui test, perioada de dozare este mai lungă decât cea din cadrul unui studiu convențional cu doză repetată de 28 de zile. Însă, acesta utilizează mai puține animale de fiecare sex pe grup, în comparație cu situația în care se efectuează un test convențional cu doze repetate de 28 de zile pe lângă un test de depistare a toxicității pentru reproducere/dezvoltare.

13. Această metodă de testare presupune administrarea substanței chimice de testat pe cale orală. Dacă se utilizează alte căi de expunere, este posibil să fie necesare modificări.

14. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

15. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

16. Substanța chimică de testat se administrează în doze gradate mai multor grupuri de masculi și femele. Doza pentru masculi ar trebui să fie administrată pentru o perioadă de cel puțin patru săptămâni până în ziua dinaintea sacrificării planificate inclusiv (aceasta include cel puțin două săptămâni înainte de împerechere, perioada de împerechere și aproximativ două săptămâni după împerechere). Având în vedere perioada de dozare limitată de pre-împerechere a masculilor, este posibil ca fertilitatea să nu fie un indicator deosebit de sensibil al toxicității testiculare. Prin urmare, este esențială o examinare histologică detaliată a testiculelor. Combinația dintre o perioadă de dozare de pre-împerechere de două săptămâni și de formulare ulterioară a observațiilor privind împerecherea/fertilitatea și o perioadă de dozare generală de cel puțin patru săptămâni, urmată de histopatologia detaliată a gonadelor de sex masculin, este considerată suficientă pentru a permite detectarea majorității efectelor asupra fertilității masculine și a spermatogenezei.

17. Femelelor ar trebui să li se administreze doze pe toată durata studiului. Aceasta include două săptămâni înainte de împerechere (cu obiectivul de a acoperi cel puțin două cicluri estrale complete), timpul variabil până la concepție, durata sarcinii și cel puțin 13 zile după parturiție, până în ziua dinaintea eutanasierii planificate inclusiv.

18. Durata studiului, în urma aclimatizării și evaluării ciclului estral înainte de dozare, depinde de performanța femelei și este de aproximativ 63 de zile, [cel puțin 14 zile înainte de împerechere, (până la) 14 zile de împerechere, 22 de zile de gestație, 13 zile de lactație].

19. În perioada de administrare, animalele sunt examinate cu atenție zilnic, în vederea identificării unor eventuale semne de toxicitate. Animalele care au murit sau care au fost eutanasiate în timpul testului sunt supuse unei autopsii, iar cele care supraviețuiesc până la sfârșitul testului sunt eutanasiate și autopsiate.

▼M8

DESCRIEREA METODEI

Selecția speciilor de animale

20. Această metodă de testare este concepută pentru a fi utilizată la șobolan. În cazul în care parametrii specificați în prezenta orientare TG nr. 422 privind testarea sunt investigați la o altă specie de rozătoare, ar trebui să se prezinte o justificare detaliată. În cadrul programului de validare internațional pentru detectarea factorilor perturbatori endocrini cu privire la TG nr. 407, șobolanul a fost singura specie folosită. Nu ar trebui să se utilizeze sușe cu fecunditate scăzută sau cu o incidență a defectelor de dezvoltare cunoscută a fi ridicată. Ar trebui să se folosească animale virgine sănătoase, care nu au fost supuse anterior unor proceduri experimentale. Animalele de experiență ar trebui să fie caracterizate în ceea ce privește specia, sușa, sexul, greutatea și vârsta. La începutul studiului, diferențele de greutate între animalele folosite ar trebui să fie minime și să nu depășească 20 % din greutatea medie pentru fiecare sex. În cazul în care studiul este realizat cu titlu de studiu preliminar pentru un studiu pe termen lung sau pentru o întreagă generație, este de preferat să se utilizeze, în ambele studii, animale din aceeași sușă și din aceeași sursă.

Adăpostire și hrănire

21. Toate procedurile ar trebui să fie în conformitate cu standardele locale privind îngrijirea animalelor de laborator. Temperatura în spațiul de adăpostire a animalelor de experiență ar trebui să fie de 22 °C (± 3 °C). Umiditatea relativă ar trebui să fie de cel puțin 30 % și să nu depășească, de preferință, 70 %, cu excepția momentelor în care se curăță spațiul. Iluminatul ar trebui să fie artificial, alternând perioade de 12 ore de lumină cu 12 ore de întuneric. Pentru alimentație, se poate utiliza hrană convențională de laborator, cu asigurarea unei cantități nelimitate de apă potabilă. Alegerea hranei poate fi influențată de necesitatea de a asigura un amestec adecvat al unei substanțe chimice de testat atunci când aceasta se administrează utilizând această metodă.

22. Animalele ar trebui să fie adăpostite în grupuri mici de același sex; animalele pot fi adăpostite individual dacă există o justificare științifică. În cazul cuștilor colective nu ar trebui să se depășească numărul de cinci animale în fiecare cușcă. Procedurile de împerechere se desfășoară în cuști adecvate acestui scop. Femelele gestante ar trebui să fie plasate în cuști individuale și prevăzute cu materiale pentru cuibărire. Femelele aflate în lactație vor fi plasate în cuști individuale împreună cu progeniturile acestora.

23. Hrana ar trebui să fie analizată în mod regulat în vederea identificării contaminanților. Ar trebui să se rețină un eșantion din hrană până la finalizarea raportului.

Pregătirea animalelor

24. Animalele adulte, tinere și sănătoase sunt distribuite în mod aleatoriu în grupuri și cuști de tratament. Cuștile ar trebui să fie dispuse astfel încât să se reducă la minim eventualele efecte datorate deplasărilor acestora. Animalele prezintă o identificare unică și sunt ținute în cuștile lor timp de minimum cinci zile înainte de începerea studiului, pentru a permite aclimatizarea acestora la condițiile de laborator.

Prepararea dozelor

25. Se recomandă administrarea orală a substanței chimice de testat, cu excepția cazului în care se consideră că sunt adecvate alte căi de administrare. Atunci când se alege calea orală, substanța chimică de testat se administrează, de obicei, prin gavaj; însă, în mod alternativ, substanțele chimice de testat pot fi administrate, de asemenea, împreună cu hrana sau cu apa potabilă.

26. Dacă este necesar, substanța chimică de testat se dizolvă sau se suspendă într-un vehicul adecvat. Se recomandă ca, ori de câte ori este posibil, să se aibă în considerare, în primul rând, utilizarea unei soluții/suspensii apoase, apoi a unei soluții/suspensii în ulei (de exemplu, ulei de porumb) și apoi a unei alte soluții posibile în alte vehicule. Pentru vehicule neapoase, ar trebui să fie cunoscute caracteristicile toxice ale vehiculului respectiv. Ar trebui să se determine stabilitatea și omogenitatea substanței chimice de testat în vehicul.

▼M8

PROCEDURA

Numărul și sexul animalelor

27. Se recomandă ca, la început, fiecare grup să aibă cel puțin 10 masculi și 12-13 femele. Femelele vor fi evaluate înainte de expunere pentru ciclicitatea estrală, iar animalele la care nu se produc cicluri tipice de 4-5 zile nu vor fi incluse în studiu; prin urmare, se recomandă femele suplimentare pentru a obține 10 femele într-un grup. Cu excepția cazului în care apar efecte toxice pronunțate, se preconizează că acesta va asigura cel puțin 8 femele gestante în fiecare grup, care reprezintă, în mod normal, numărul minim acceptabil de femele gestante într-un grup. Obiectivul este să se asigure un număr suficient de sarcini și pui pentru a asigura o evaluare semnificativă a potențialului substanței chimice de testat de a afecta fertilitatea, sarcina și comportamentul matern și de supt, precum și creșterea și dezvoltarea puilor F_1, de la concepție până în ziua 13 a perioadei post-partum. Dacă sunt planificate eutanasieri intermediare, numărul ar trebui suplimentat cu numărul de animale planificate să fie eutanasiate înainte de încheierea studiului. În plus, ar trebui să se aibă în vedere un grup satelit suplimentar de cinci animale pe grup pe sex în grupul martor și în grupul cu doza maximă, pentru observații privind reversibilitatea, persistența sau apariția tardivă a efectelor sistemice toxice pe parcursul a minimum 14 zile după tratament. Animalele din grupurile satelit nu vor fi împerecheate și, în consecință, nu sunt utilizate pentru evaluarea toxicității pentru reproducere/dezvoltare.

Dozare

28. În general, ar trebui să se utilizeze cel puțin trei grupuri de testare tratate și un grup martor. Dacă nu există date generale adecvate privind toxicitatea, se realizează un studiu de stabilire a intervalului (animale din aceeași sușă și sursă), pentru a contribui la determinarea dozelor care vor fi administrate. Cu excepția tratării cu substanța chimică de testat, animalele din grupul martor ar trebui să fie tratate în mod identic cu animalele din grupul de testare. Dacă pentru administrarea substanței chimice de testat se folosește un vehicul, acesta se administrează grupului martor în volumul maxim utilizat.

29. Dozele ar trebui să fie selectate ținându-se cont de toxicitatea existentă și de datele toxico-cinetice disponibile. De asemenea, ar trebui să se țină seama de faptul că ar putea exista diferențe de sensibilitate între animalele gestante și cele negestante. Ar trebui să fie aleasă doza cea mai mare pentru a induce efecte toxice, însă nu moartea sau o suferință evidentă. Ulterior, ar trebui să se selecteze o serie de doze descrescătoare pentru a demonstra orice răspuns legat de doză și faptul că nu există efecte adverse la doza minimă. Cele mai bună soluții constau de multe ori în alegerea a două sau patru intervale, iar adăugarea unui al patrulea grup de testare este adesea preferabilă utilizării unor intervale foarte mari (de exemplu, care depășesc factorul 10) între dozaje.

30. În prezența toxicității generale observate (de exemplu, greutate corporală redusă, efecte asupra ficatului, plămânilor sau rinichilor etc.) sau a altor schimbări care pot să nu constituie răspunsuri toxice (de exemplu, consum de hrană redus, mărirea ficatului), efectele observate asupra punctelor finale endocrine sensibile ar trebui să fie interpretate cu precauție.

Testul valorilor-limită

31. Dacă un studiu oral efectuat pe baza procedurilor descrise în prezentul studiu, la o doză de cel puțin 1 000 mg/kg greutate corporală/zi sau, în cazul administrării împreună cu hrana, la un procent echivalent în hrană sau în apa de băut (în funcție de valorile greutății corporale), nu produce efecte toxice detectabile și dacă datele despre substanțe cu structuri asemănătoare nu indică toxicitatea, atunci este posibil să nu fie necesar să se realizeze un studiu complet cu mai multe doze. Testul la valori-limită este

▼M8

justificat, cu excepția cazului în care condițiile de expunere umană impun utilizarea unei doze mai ridicate. Pentru alte tipuri de administrare, cum sunt inhalarea sau aplicarea dermică, este posibil ca proprietățile fizice și chimice ale substanțelor chimice de testat să determine deseori nivelul maxim posibil al expunerii.

Administrarea dozelor

32. Animalelor li se administrează substanța chimică de testat zilnic, timp de 7 zile pe săptămână. Când substanța chimică de testat este administrată prin gavaj, administrarea ar trebui să fie în doză unică la animale, folosind o sondă gastrică sau o canulă de intubare adecvată. Volumul maxim de lichid care poate fi administrat o dată depinde de dimensiunea animalului de experiență. Volumul nu ar trebui să depășească 1 ml/100 g greutate corporală, exceptând cazul soluțiilor apoase, când se pot utiliza 2 ml/100 g greutate corporală. Cu excepția substanțelor chimice de testat iritante sau corozive care vor produc, de regulă, efecte exacerbate la concentrații mai mari, variabilitatea volumului de testat ar trebui să fie redusă la minim prin ajustarea concentrației, astfel încât să se asigure un volum constant la toate nivelurile de dozare.

33. Pentru substanțele chimice de testat administrate în hrană sau în apa potabilă, este important să se asigure că respectivele cantități de substanță chimică de testat implicate nu influențează nutriția normală sau echilibrul hidric. Dacă substanța chimică de testat se administrează în hrană, aceasta poate fi administrată fie într-o concentrație constantă în alimentație (ppm), fie la o doză constantă în raport cu greutatea corporală a animalelor; alternativa utilizată ar trebui precizată. În cazul unei substanțe chimice de testat administrate prin gavaj, doza ar trebui să se administreze la aproximativ aceeași oră în fiecare zi și să fie ajustată cel puțin săptămânal pentru a menține un nivel constant al dozei în funcție de greutatea corporală a animalului. În cazul în care studiul combinat este utilizat cu titlu preliminar unui studiu de toxicitate pentru reproducere pe termen lung sau complet, în ambele studii ar trebui să se utilizeze o alimentație similară.

Schema de tratament

34. Administrarea dozelor la ambele sexe ar trebui să înceapă cu două săptămâni înainte de împerechere, după ce acestea au fost aclimatizate timp de cel puțin cinci zile, iar femelele au fost supuse unui control privind ciclurile estrale normale (într-o perioadă de pre-tratament de 2 săptămâni). Studiul ar trebui să fie planificat în așa fel încât evaluarea ciclului estral să înceapă de îndată ce animalele au ajuns la maturitatea sexuală deplină. Aceasta ar putea varia ușor între diferite sușe de șobolani din diferite laboratoare, de exemplu, la șobolanii Sprague Dawley aceasta este la vârsta de 10 săptămâni, la șobolanii Wistar la vârsta de aproximativ 12 săptămâni. Femelele cu pui ar trebui să fie eutanasiate în ziua 13 post-partum sau imediat după aceea. Pentru a permite nealimentarea pe timpul nopții a femelelor înainte de recoltarea sângelui (dacă se preferă această opțiune), nu este necesar ca femelele și puii lor să fie eutanasiați în aceeași zi. Ziua nașterii (și anume, atunci când s-a încheiat parturiția) este definită ca fiind ziua 0 post-partum. Femelele care nu prezintă semne ale copulației sunt eutanasiate după 24-26 zile de la ultima zi a perioadei de împerechere. Administrarea dozelor continuă la ambele sexe în perioada de împerechere. Masculilor ar trebui să li se administreze în continuare doze după perioada de împerechere cel puțin până la încheierea perioadei de dozare minime totale de 28 de zile. Apoi aceștia sunt eutanasiați sau, alternativ, sunt reținuți pentru administrarea în continuare a dozelor pentru o posibilă desfășurare a unei a doua împerecheri, dacă se consideră că este cazul.

35. Administrarea de doze zilnice la femelele parentale ar trebui să continue pe întreaga durată a sarcinii și cel puțin până în ziua 13 post-partum inclusiv sau cu o zi înainte de sacrificare. În cazul studiilor în care substanța chimică de testat se administrează prin inhalare sau subcutanat, dozele ar trebui să fie administrate în continuare cel puțin până în ziua 19 de sarcină inclusiv și administrate din nou cât mai curând posibil, dar nu mai târziu de ziua post-fătare (PND) 4.

▼M8

36. Animalele dintr-un grup satelit planificate pentru observații ulterioare, dacă acestea sunt incluse, nu sunt împerecheate. Acestea ar trebui păstrate timp de cel puțin încă 14 zile după prima eutanasiere programată a femelelor, fără a se aplica un tratament pentru a detecta apariția tardivă sau persistența efectelor toxice ori recuperarea de pe urma acestora.

37. În apendicele 2 este prezentată o diagramă a schemei de tratament.

Cicluri estrale

38. Înainte de a începe tratamentul, ar trebui să se monitorizeze ciclurile estrale pentru femelele studiate cu ciclicitate regulate (a se vedea punctul 27). De asemenea, frotiul vaginal ar trebui să fie monitorizat zilnic de la începutul perioadei de tratament, până la obținerea dovezii împerecherii. În cazul în care există motive de îngrijorare cu privire la efecte de criză acută care ar putea modifica ciclurile estrale odată cu inițierea administrării dozelor, laboratoarele pot să expună animalele de experiență timp de două săptămâni, apoi să colecteze frotiuri vaginale zilnic pentru a monitoriza ciclul estral timp de cel puțin două săptămâni în perioada de pre-împerechere, cu o continuare a monitorizării în perioada de împerechere până când există dovezi ale împerecherii. Atunci când se obțin celule vaginale/cervicale, ar trebui să se evite orice perturbare a mucoasei, care ar putea induce pseudogestația (8) (9).

Procedura de împerechere

39. De regulă, în prezentul studiu ar trebui utilizate împerecheri 1:1 (un mascul la o femelă). Pot exista excepții în cazul deceselor ocazionale ale masculilor. Femela ar trebui să fie plasată împreună cu același mascul până când se observă semne ale copulației sau au trecut două săptămâni. În fiecare dimineață, femelele ar trebui să fie examinate pentru a se constata prezența spermei sau a dopului vaginal. Ziua 0 a gestației este definită ca fiind ziua în care se confirmă dovada împerecherii (se constată existența unui dop vaginal sau a spermei). În cazul în care împerecherea a eșuat, se poate lua în calcul reîmperecherea femelelor în cauză cu masculi din același grup care și-au dovedit capacitatea reproductivă.

Dimensiunea seriei de pui

40. În ziua 4 de după naștere, dimensiunea fiecărei serii de pui poate fi ajustată prin eliminarea puilor suplimentari printr-o selecție aleatorie pentru a obține, pe cât posibil, patru sau cinci pui per sex per serie, în funcție de dimensiunea normală a seriei la sușa de șobolani utilizați. Ar trebui să se recolteze probe de sânge de la doi dintre puii în exces, care să fie grupate și utilizate pentru determinarea nivelurilor de T4 din ser. Eliminarea selectivă a puilor, de exemplu, pe baza greutății corporale sau a distanței anogenitale (AGD) nu este adecvată. Ori de câte ori numărul de pui masculi sau femele împiedică obținerea unui număr de patru sau cinci exemplare din fiecare sex per serie, se acceptă ajustarea parțială (de exemplu, șase masculi și patru femele). Nu se vor elimina pui dacă dimensiunea seriei va scădea sub ținta de sacrificare (8 sau 10 de pui/serie). Dacă există un singur pui peste obiectivul de sacrificare, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

41. Dacă dimensiunea seriei nu este ajustată, se sacrifică doi pui per serie în ziua 4, după naștere, și se iau probe de sânge pentru măsurarea concentrațiilor de hormoni tiroidieni din ser. Dacă este posibil, cei doi pui per serie ar trebui să fie pui de sex feminin pentru a rezerva puii masculi în vederea evaluării retenției mamelonului, cu excepția cazului în care în urma îndepărtării puilor respectivi nu mai rămân femele pentru evaluare la încheierea procesului. Nu se vor elimina pui în cazul în care dimensiunea seriei va scădea sub 8 sau 10 pui/serie (în funcție de dimensiunea normală a seriei în sușa de șobolani utilizată). Dacă există un singur pui peste dimensiunea normală a seriei, se va elimina doar un singur pui, acesta fiind utilizat pentru recoltarea de sânge pentru posibile evaluări ale serului T4.

▼M8

Observații

42. Ar trebui să se formuleze observații clinice generale cel puțin o dată pe zi, de preferat la aceeași oră (aceleași ore) în fiecare zi, luând în considerare perioada de vârf a efectelor anticipate după administrare. Ar trebui să se consemneze starea de sănătate a animalelor. Toate animalele sunt examinate cel puțin de două ori pe zi, pentru a se determina morbiditatea sau mortalitatea.

43. Toate animalele parentale ar trebui să fie supuse unor observații clinice detaliate înaintea primei expuneri (pentru a permite comparații la nivelul aceluiași individ) și cel puțin o dată pe săptămână în perioada următoare. Aceste observații ar trebui să fie formulate în afara cuștii animalelor, într-o incintă standard, și, de preferință, la aceeași oră în fiecare zi. Acestea ar trebui să fie înregistrate cu atenție; de preferat, utilizând sisteme de punctare definite în mod explicit de laboratorul de testare. Ar trebui să se depună eforturi pentru a se asigura un nivel minim al variațiilor de la nivelul condițiilor de laborator, iar observațiile sunt formulate, de preferință, de către observatori care nu sunt informați asupra tratamentului. Simptomele consemnate ar trebui să includă, printre altele, modificări la nivelul pielii, blănii, ochilor, membranelor mucoase, apariția unor secreții și excreții și activitatea reflexă (de exemplu, lăcrimarea, erecția piloasă, mărimea pupilei, respirație anormală). Ar trebui să se consemneze, de asemenea, toate modificările de comportament, modificările posturii sau ale reacțiilor la manipulare, precum și apariția unor mișcări clonice sau tonice, a unor comportamente stereotipe (de exemplu, curățare excesivă, mișcări circulare repetate), parturiția dificilă sau prelungită sau orice comportament bizar (automutilare, mers cu spatele) (10).

44. O singură dată în timpul studiului, ar trebui să fie efectuată reactivitatea senzorială la diferiți stimuli (de exemplu, stimuli auditivi, vizuali și proprioceptivi) (8) (9) (11), evaluarea forței de prindere (12) și evaluarea activității motorii (13) la cinci masculi și cinci femele, selectați în mod aleatoriu din fiecare grup. Detalii suplimentare referitoare la procedurile care ar putea fi urmate sunt prezentate în referințele bibliografice respective. Însă, ar putea fi utilizate, de asemenea, proceduri alternative celor menționate. La masculi, aceste observații funcționale ar trebui să fie formulate către sfârșitul perioadei de administrare a dozelor, cu puțin timp înainte de momentul programat pentru eutanasiere, dar înainte de recoltarea de sânge pentru analize hematologice sau chimice clinice (a se vedea punctele 53-56, inclusiv nota de subsol 1). Femelele ar trebui să fie într-o stare similară din punct de vedere fiziologic în cursul acestor teste funcționale și ar trebui, de preferință, să fie testate o singură dată în ultima săptămână de lactație (de exemplu, zilele de lactație LD 6-13), cu puțin timp înainte de ziua planificată pentru eutanasiere. În măsura în care este posibil, se reduc la minimum perioadele de separare a femelelor de pui.

45. Observațiile funcționale formulate o singură dată spre sfârșitul studiului ar putea fi omise atunci când studiul este realizat cu titlu preliminar unui studiu subcronic (de 90 de zile) unui studiu pe termen lung. În acest caz, observațiile funcționale ar trebui să facă parte din acest studiu realizat în continuare. Pe de altă parte, disponibilitatea datelor despre observații funcționale formulate ca urmare a acestui studiu cu administrare de doze repetate ar putea spori capacitatea de a alege doze pentru un studiu ulterior subcronic sau pe termen lung.

46. În mod excepțional, observațiile funcționale pot fi, de asemenea, omise pentru grupuri care prezintă, de altfel, simptome de toxicitate în asemenea măsură încât ar influența semnificativ desfășurarea testului funcțional.

47. Durata gestației ar trebui să fie înregistrată, calculându-se din ziua 0 de gestație. Fiecare serie de pui ar trebui să fie examinată cât mai curând posibil după naștere, pentru a se stabili numărul și sexul puilor, puii născuți morți, puii vii, puii subdezvoltați (puii care sunt semnificativ mai mici decât puii corespunzători din grupul martor) și prezența unor anomalii macroscopice.

▼M8

48. În termen de 24 de ore de la parturiție, puii vii ar trebui să fie numărați și separați pe sexe, iar seriile de pui cântărite (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Pe lângă observațiile privind animalele părinți (a se vedea punctele 43 și 44), ar trebui să fie consemnat orice comportament anormal al puiului.

49. Este necesar ca AGD a fiecărui pui să fie măsurată în aceeași zi post-natală de la PND 0 până la PND 4. Greutatea corporală a puilor ar trebui să fie consemnează în ziua în care se măsoară AGD, aceasta trebuind să fie normalizată la o valoare aferentă dimensiunii puiului, de preferat, rădăcina cubică a greutății corporale (14). Numărul sfârcurilor/aureolelor la puii masculi ar trebui să fie calculat în PND 12 sau 13, astfel cum se recomandă în Orientarea nr. 151 a OCDE (15).

Greutate corporală și consumul de hrană/apă

50. Masculii și femelele ar trebui să fie cântărite în prima zi a administrării dozelor, apoi cel puțin săptămânal și la sfârșit. În timpul sarcinii, femelele ar trebui să fie cântărite în zilele 0, 7, 14 și 20 și în termen de 24 de ore de la parturiție (în ziua 0 sau 1 post-partum) și cel puțin în zilele 4 și 13 post-partum. Aceste observații ar trebui să fie consemnate individual pentru fiecare animal adult.

51. În perioada de pre-împerechere, de sarcină și de alăptare, consumul de alimente ar trebui să fie măsurat cel puțin o dată pe săptămână. Măsurarea consumului de hrană în timpul împerecherii este opțională. Pe parcursul acestor perioade, consumul de apă ar trebui, de asemenea, să fie măsurat atunci când substanța chimică de testat este administrată în mediul respectiv.

Hematologie

52. O dată pe parcursul studiului, următoarele examinări hematologice ar trebui să fie efectuate la cinci masculi și cinci femele selectate aleatoriu din fiecare grup: hematocritul, concentrațiile de hemoglobină, numărul de eritrocite, reticulocitele, numărul total de leucocite și formula leucocitară diferențiată, numărul de trombocite și timpul/potențialul de coagulare. Printre alte determinări care ar trebui să fie efectuate, în cazul în care substanța chimică de testat sau eventualii săi metaboliți au sau se presupune că au proprietăți oxidante, se numără concentrația de methemoglobină și corpii Heinz.

53. Probele de sânge ar trebui să fie prelevate dintr-un loc desemnat. În timpul eșantionării, femelele ar trebui să se afle într-o stare similară din punct de vedere fiziologic. Pentru a evita dificultățile practice legate de variabilitatea declanșării gestației, recoltarea sângelui la femele se poate face la sfârșitul perioadei de pre-împerechere, ca alternativă la eșantionare imediat înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în cadrul acesteia. Probele de sânge de la masculi ar trebui să fie prelevate, de preferință, înainte de sau în cadrul procedurii de eutanasiere a animalelor. În mod alternativ, recoltarea de sânge la masculi poate fi realizată, de asemenea, la sfârșitul perioadei de pre-împerechere, atunci când acest moment a fost preferat pentru femele.

54. Probele de sânge ar trebui să fie păstrate în condiții adecvate.

Biochimia clinică

55. Determinările de biochimie clinică în scopul de a investiga efectele toxice majore asupra țesuturilor și, în special, efectele asupra rinichiului și a ficatului, ar trebui să fie realizate pe probe de sânge prelevate de la cinci masculi și cinci femele selectați din fiecare grup. Se recomandă ca animalele să nu

▼M8

primească hrană în noaptea dinaintea recoltării ([1]). Investigațiile plasmei sau ale serului ar trebui să includă analizele pentru sodiu, potasiu, glucoză, colesterolul total, uree, creatinină, proteine totale și albumină, cel puțin pentru două enzime revelatoare ale efectelor hepatocelulare (cum ar fi alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza și sorbitol dezhidrogenaza) și acizii biliari. În anumite împrejurări, valorile de măsurare a unor enzime suplimentare (de origine hepatică sau de altă origine) și a bilirubinei pot furniza informații utile.

56. Sunt prelevate probe de sânge dintr-un anumit loc pe baza următorului calendar:

— de la cel puțin doi pui pe serie în ziua 4, după naștere, în cazul în care numărul puilor permite acest lucru (a se vedea punctele 40-41)

— de la toate femelele și de la cel puțin doi pui pe serie la încheiere, în ziua 13, și

— de la toți masculii adulți, la încheiere

Toate probele de sânge sunt păstrate în condiții adecvate. Sunt analizate probe de sânge de la pui din ziua 13 și de la masculii adulți pentru identificarea nivelurilor de hormoni tiroidieni din ser (T4). Dacă se consideră că este relevant, sunt efectuate analize suplimentare ale T4 din probele de sânge de la femele și de la puii din ziua 4. Opțional, dacă se consideră relevant, ar putea fi măsurați și alți hormoni. Probele de sânge ale puilor pot fi grupate pe serii pentru analize ale hormonilor tiroidieni. Hormonii tiroidieni (T4 și TSH) ar trebui, de preferință, să fie măsurați ca „valoare totală”.

57. Opțional, ar putea fi efectuate următoarele analize de urină la cinci masculi selectați aleatoriu din fiecare grup în ultima săptămână a studiului, cu recoltarea urinei într-un interval de timp; aspect, volum, osmolalitate sau densitate specifică, pH, proteinurie, glucozurie, hematurie.

58. În plus, ar trebui să fie avute în vedere investigații asupra markerilor din ser care indică lezarea generală a țesuturilor. Alte determinări care ar trebui să fie efectuate dacă proprietățile cunoscute ale substanței chimice de testat pot sau sunt susceptibile de a afecta profilurile metabolice includ măsurarea calciului, a fosfatului, a trigliceridelor măsurate după perioada fără hrană, a glucozei după perioada fără hrană, a hormonilor specifici, a methemoglobinei și a colinesterazei. Acestea trebuie să fie identificate de la caz la caz.

59. Următorii factori pot influența variabilitatea și concentrațiile absolute ale valorilor hormonale determinate:

— momentul eutanasierii, din cauza variației diurne a concentrațiilor hormonale

([1]) Pentru o serie de măsurători efectuate pe ser și plasmă, în special pentru glucoză, se recomandă să nu se administreze hrana peste noapte. Motivul principal pentru această preferință este că variabilitatea crescută care ar rezulta inevitabil în urma consumului de hrană ar putea să mascheze efecte mai subtile și să îngreuneze interpretarea. Pe de altă parte, însă, neadministrarea hranei pe timpul nopții poate să influențeze metabolismul general al animalelor (însărcinate), perturbă alăptarea și comportamentul de alăptare și, mai ales în studiile privind hrănirea, poate să perturbe expunerea zilnică la substanța chimică de testat. Dacă se adoptă decizia de nealimentare pe timpul nopții, ar trebui să fie realizate determinări biochimice clinice după formularea de observații funcționale în săptămâna a patra de studiu pentru masculi. Femelele ar trebui să fie reținute pentru încă o zi după ce au fost eliminați puii, de exemplu, în PND 13. Femelele ar trebui să nu fie alimentate în timpul nopții, între zilele de lactație 13-14, iar sângele terminal ar trebui să fie utilizat pentru identificarea parametrilor de chimie clinică.

▼M8

— metoda de eutanasiere pentru a evita stresul nejustificat exercitat asupra animalelor, care poate afecta concentrațiile hormonale;

— seturile de testare pentru determinările hormonale, care pot varia prin curbele lor standard.

60. Probele de plasmă prevăzute în mod specific pentru determinarea hormonală ar trebui să fie obținute la momente comparabile din zi. Valorile numerice obținute la analiza concentrațiilor hormonale diferă în funcție de diferitele seturi de testare comerciale.

61. Dacă informațiile de referință istorice nu sunt adecvate, ar trebui să se aibă în vedere determinarea variabilelor hematologice și biochimice clinice înaintea începerii administrării dozelor sau, de preferință, la un grup de animale neincluse în grupurile experimentale. În cazul femelelor, datele trebuie să fie asigurate de la animale în lactație.

PATOLOGIE

Autopsie macroscopică

62. Toate animalele adulte cuprinse în studiu ar trebui să fie supuse unei autopsii generale complete și detaliate, care cuprinde examinarea atentă a suprafeței externe a corpului, a tuturor orificiilor, a cavității craniene, toracice și abdominale, precum și a conținutului acestora. Se acordă o atenție deosebită organelor sistemului de reproducere. Ar trebui să se înregistreze numărul de locuri de implantare. Ar trebui să se examineze frotiurile vaginale în ziua autopsiei pentru a determina stadiul ciclului estral și pentru a permite corelarea cu histopatologia organelor de reproducere feminine.

63. Testiculele și epididimitele, precum și prostata și veziculele seminale cu glande coagulante în ansamblu, ale tuturor masculilor adulți ar trebui să fie curățate de țesuturile aderente, după caz, și greutatea umedă a acestora înregistrată cât mai curând posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. În plus, greutățile opționale ale organelor ar putea include complexul muscular levatorul ani plus bulbocavernos, glandele Cowper și glandul penisului la masculi și ovarele (greutate umedă) cuplate cu uterul (inclusiv colul uterin) la femele; dacă sunt incluse, aceste greutăți ar trebui să fie colectate cât mai curând posibil după disecție. Ar trebui să se păstreze ovarele, testiculele, epididimurile, organele sexuale conexe și toate organele care prezintă leziuni macroscopice la toate animalele adulte.

64. De la toți masculii și femelele adulte și de la un pui mascul și un pui femelă din ziua 13, din fiecare serie, ar trebui să se păstreze glandele tiroide în cel mai adecvat mediu de fixare pentru examenul histopatologic prevăzut ulterior. După fixare ar putea fi determinată greutatea tiroidei. Curățarea ar trebui să fie făcută, de asemenea, foarte atent și doar după fixare, pentru a evita deteriorarea țesuturilor. Deteriorarea țesuturilor ar putea compromite analiza histopatologică. Ar trebui să se recolteze probe de sânge dintr-un loc desemnat imediat înainte de procedura de eutanasiere a animalelor sau în cadrul acesteia, care să fie păstrate în condiții adecvate (a se vedea punctul 56).

▼M8

65. În plus, pentru cel puțin cinci masculi și femele adulte, care sunt selectați aleatoriu din fiecare grup (în afară de cele muribunde și/sau eutanasiate înainte de încheierea studiului), ar trebui să se curețe ficatul, rinichii, glandele suprarenale, timusul, splina, creierul și inima de orice țesuturi aderente, după caz, și să se consemneze greutatea umedă a acestora cât mai repede posibil după disecție, pentru a se evita deshidratarea. Țesuturile următoare ar trebui să fie păstrate în cel mai adecvat mediu de fixare atât pentru tipul de țesut, cât și pentru examenul histopatologic prevăzut ulterior: toate țesuturile care prezintă leziuni macroscopice, encefalul (regiuni reprezentative: creierul mare, cerebelul și puntea), măduva spinării, ochiul, stomacul, intestinul subțire, intestinul gros (inclusiv plăcile Peyer), ficatul, rinichii, glandele suprarenale, splina, inima, timusul, tiroida, traheea și plămânii (conservați prin umflare cu fixativ și imersie ulterioară), gonadele (testiculele și ovarele), organele genitale anexe (de exemplu, uterul și colul, epididimul, prostata + veziculele seminale cu glandele coagulante), vaginul, vezica urinară, ganglionii limfatici [în afară de cel mai apropiat ganglion de drenare, ar trebui să fie prelevat încă un ganglion limfatic, conform experienței laboratorului (16)], nervul periferic (sciatic sau tibial), de preferință foarte aproape de mușchi, mușchiul scheletic și osul cu măduvă osoasă (secțiune sau, ca alternativă, aspirat de măduvă osoasă proaspăt fixat pe lamă). Se recomandă fixarea testiculelor prin imersie în fixator Bouin sau Davidson modificat (16) (17) (18); pentru aceste țesuturi nu se recomandă utilizarea formolului. Tunica albuginea ar putea fi perforată ușor și superficial cu un ac la ambii poli ai organului pentru a permite pătrunderea rapidă a fixatorului. Observațiile clinice și cele de altă natură pot sugera necesitatea examinării unor țesuturi suplimentare. Ar trebui conservate și alte organe considerate posibile organe-țintă pentru substanța chimică de testat, având în vedere proprietățile cunoscute ale acesteia.

66. Următoarele țesuturi pot furniza indicații valoroase privind efectele asupra sistemului endocrin: gonadele (ovarele și testiculele), organele sexuale accesorii (uterul, inclusiv colul uterin, epididimul, veziculele seminale cu glandele coagulante, prostata dorso-laterală și ventrală), vaginul, hipofiza, glanda mamară masculină și glanda suprarenală. Modificările glandelor mamare masculine nu au fost suficient documentate dar acest parametru poate fi foarte sensibil la substanțe cu acțiune estrogenică. Observarea organelor/țesuturilor care nu sunt enumerate la punctul 65 este opțională.

67. Puii morți și puii eutanasiați în ziua 13 post-partum, sau imediat după aceea, ar trebui să fie cel puțin examinați cu atenție la exterior pentru identificarea anomaliilor macroscopice. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită organelor genitale de reproducere externe, care ar trebui să fie examinate pentru identificarea unor modificări în dezvoltare.

Histopatologie

68. Ar trebui să se efectueze un examen histopatologic complet al organelor și țesuturilor conservate de la animalele selectate din grupurile martor și grupurile tratate cu doza maximă (se pune un accent deosebit pe fazele spermatogenezei la gonadele masculine și pe histopatologia structurii celulare testiculare interstițiale). Ar putea fi examinată, dacă este necesar, glanda tiroidă la pui la pui și la animalele adulte rămase. Aceste examene ar trebui să fie extinse la animalele din grupuri tratate cu alte doze, dacă se constată modificări legate de tratament la grupul tratat cu doză mare. Ghidul privind histopatologia (10) prezintă detalii suplimentare privind disecția, fixarea, secționarea și histopatologia țesuturilor endocrine.

69. Ar trebui să se examineze toate leziunile macroscopice. Pentru a contribui la identificarea NOAEL, ar trebui să se examineze organele-țintă din alte grupuri de dozare, în special din grupuri pentru care s-a susținut existența NOAEL.

▼M8

70. Atunci când se folosește un grup satelit, ar trebui să se efectueze un examen histopatologic al țesuturilor și organelor la care au fost identificate efecte în grupurile tratate.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

71. Ar trebui să fie furnizate date despre fiecare animal. În plus, toate datele ar trebui să fie sintetizate în format tabelar, prezentându-se, pentru fiecare grup de testare, numărul de animale la începutul testului, numărul de animale găsite moarte în cursul testului sau eutanasiate, data decesului sau a eutanasierii, numărul de animale fertile, numărul de femele gestante, numărul de animale care prezintă semne de toxicitate, o descriere a semnelor de toxicitate observate, inclusiv momentul declanșării, durata și gravitatea efectelor toxice, tipul de modificări histopatologice și toate datele relevante privind seriile. În apendicele 3 este prezentat un format tabelar de raport de sinteză care s-a dovedit a fi foarte util pentru evaluarea efectelor privind reproducerea/dezvoltarea.

72. Dacă este posibil, rezultatele numerice ar trebui să fie evaluate cu ajutorul unei metode statistice adecvate și general acceptate. Pentru comparațiile efectelor pe un interval de dozare ar trebui să se evite recurgerea la teste t multiple. Metodele statistice ar trebui să fie alese în faza de proiectare a studiului. Analiza statistică a AGD și a retenției sfârcurilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luate în considerare efectele asupra seriei. Dacă este cazul, seria constituie unitatea de analiză. Analiza statistică a greutății corporale a puilor ar trebui să se bazeze pe date individuale despre pui, fiind luată în considerare dimensiunea seriei. Din cauza dimensiunilor limitate ale studiului, analizele statistice sub formă de teste de „semnificație” au o valoare limitată pentru multe puncte finale, în special punctele finale privind reproducerea. Unele dintre cele mai utilizate metode, în special testele parametrice pentru măsurarea tendinței centrale, nu sunt adecvate. În cazul în care se utilizează analize statistice, atunci metoda aleasă ar trebui să fie adecvată pentru distribuirea variabilei examinate și să fie aleasă înainte de începerea studiului.

Evaluarea rezultatelor

73. Constatările acestui studiu de toxicitate ar trebui să fie evaluate sub aspectul efectelor observate, al autopsiei și al constatărilor microscopice. Evaluarea va include relația dintre doza de substanță chimică de testat și prezența sau absența, incidența și gravitatea unor anomalii, inclusiv leziuni macroscopice, organe țintă identificate, efecte asupra fertilității, anomalii clinice, efecte asupra performanței de reproducere și a seriei, modificări ale greutății corporale, efecte asupra mortalității și orice alte efecte toxice.

74. Din cauza perioadei scurte de tratament a masculului, histopatologia testiculelor și a epididimitelor ar trebui luată în considerare împreună cu datele privind fertilitatea la evaluarea efectelor de reproducere la masculi. Utilizarea datelor istorice privind martorii cu privire la reproducere/dezvoltare (de exemplu, pentru dimensiunea seriei, AGD, retenția sfârcurilor, nivelurile T4 din ser), dacă există, ar putea fi utile, de asemenea, pentru interpretarea studiului.

75. Pentru controlul calității, se propune colectarea datelor anterioare privind martorii și calcularea coeficienților de variație pentru datele numerice, în special pentru parametrii corelați cu detectarea perturbatorilor endocrini. Aceste date pot fi folosite în scop de comparație la evaluarea studiilor curente.

▼M8

Raportul testului

76. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB-uri și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Vehicul (dacă este cazul):

— justificarea alegerii vehiculului dacă este altul decât apa.

Animale de testare:

— specia/sușa utilizată;

— numărul, vârsta și sexul animalelor;

— sursa, condițiile de adăpost, regimul alimentar etc.;

— greutatea fiecărui animal la începutul testului.

— justificarea, în cazul în care se folosesc alte specii decât șobolanul

Condiții de testare:

— justificarea selecției nivelului dozei administrate;

— detalii privind formularea substanței chimice de testat/prepararea hranei, concentrația obținută, stabilitatea și omogenitatea preparatului;

▼**M8**

— detalii privind administrarea substanței chimice de testat;

— conversia concentrației substanței chimice de testat (ppm) în hrană/apa potabilă în doza reală (mg/kg greutate corporală/zi), dacă este cazul;

— detalii cu privire la calitatea hranei și a apei;

— descriere detaliată a procedurii de randomizare pentru selecția puilor pentru sacrificare, dacă aceştia sunt sacrificați.

Rezultate:

— greutatea corporală/modificările în greutatea corporală;

— consumul de hrană și apă, dacă este cazul;

— date privind răspunsul toxic pe sexe și doză, inclusiv fertilitatea, gestația și orice alte semne de

— toxicitate;

— durata gestației; efecte toxice sau de altă natură asupra reproducerii, puilor, creșterii postnatale etc.;

— natura, gravitatea și durata observațiilor clinice (reversibile sau nu);

— evaluările activității senzoriale, a forței de prindere și a activității motorii;

— examenele hematologice și valorile de referință relevante;

— examenele de biochimie clinică și valorile de referință relevante;

— numărul de femele adulte cu ciclu estral normal sau anormal și durata ciclului;

— numărul de pui născuți vii și de pierderi după implantare;

— numărul de pui cu anomalii vizibile macroscopice; evaluarea brută a organelor genitale externe, a numărului de pui subdezvoltați;

— momentul decesului în timpul studiului sau indicarea faptului că animalele au supraviețuit experimentului;

— numărul de implantări, dimensiunea seriei și valori ale greutății seriei la momentul înregistrării;

— date privind greutatea corporală a puilor;

— AGD a tuturor puilor (și greutatea corporală în ziua măsurării AGD)

— retenția sfârcurilor la puii masculi;

— nivelurile hormonilor tiroidieni la pui din ziua 13 și masculi adulți (și femele și pui din ziua 4, dacă se măsoară)

— greutatea corporală la sacrificare și date privind greutatea organelor în cazul animalelor părinți;

— rezultatele autopsiei;

— o descriere detaliată a constatărilor histopatologice;

— date privind absorbția (dacă există);

— tratarea statistică a rezultatelor, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor.

Concluzii.

▼M8

Interpretarea rezultatelor

77. Studiul va furniza evaluări ale toxicității pentru reproducere/dezvoltare, prin corelare cu administrarea de doze repetate. În mod specific, întrucât accentul este plasat atât pe punctele finale de toxicitate generală, cât și pe cele de toxicitate pentru reproducere/dezvoltare, rezultatele studiului vor permite diferențierea între efectele asupra reproducerii/dezvoltării care se produc în absența toxicității generale și cele care se manifestă doar la niveluri care sunt toxice, de asemenea, pentru animalele părinți (a se vedea punctele 7-11). Acesta ar putea indica dacă este necesar să se efectueze investigații suplimentare și ar putea oferi îndrumări în proiectarea studiilor ulterioare. Ar trebui să se consulte Documentul de orientare nr. 43 al OCDE pentru ajutor în interpretarea rezultatelor privind reproducerea și dezvoltarea (19). Documentul de orientare nr. 106 al OCDE privind evaluarea histologică a testelor endocrine și a testelor de reproducere la rozătoare (16) furnizează informații cu privire la pregătirea și evaluarea organelor (endocrine) și a frotiurilor vaginale care pot fi utile pentru această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27-29 octombrie 1992. Disponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. și Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. și Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 martie 1998, Dispponibil, la cerere, la Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris

(6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 217), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 19), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. și Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, partea B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, în Auston C.R. and Short R.V. (editori), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (nr. 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. și Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. și Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp și V.L. Reynolds. (1999). „Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 151). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(16) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 106) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(17) Hess RA și Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. În: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE și Heindel JJ (editori). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol*. *Pathol*. 30, 524-533.

(19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 43), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII [A SE VEDEA, DE ASEMENEA, ORIENTAREA NR. 150 A OCDE PUNCTUL (20)]

Androgenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiandrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon androgen natural (de exemplu, testosteron) în organismul unui mamifer.

Antiestrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Activitatea antitiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea unui hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Toxicitate pentru dezvoltare manifestarea toxicității pentru reproducere, reprezentând afecțiuni prenatale, perinatale, postnatale, structurale sau funcționale ale progeniturii.

Doză înseamnă cantitatea de substanță chimică de testat administrată. Doza este exprimată ca greutate a substanței chimice de testat pe unitatea de greutate corporală a animalului de experiență pe zi (de exemplu, mg/kg greutate corporală/zi) sau ca o concentrație constantă în regimul alimentar.

Dozarea este un termen general care cuprinde doza, frecvența și durata administrării dozei.

Toxicitatea evidentă este un termen general care descrie semne clare de toxicitate în urma administrării unei substanțe chimice de testat. Aceste semne ar trebui să fie suficiente pentru a permite o evaluare a pericolelor și ar trebui să fie de așa natură încât o creștere a dozei administrate să poată fi prevăzută a declanșa apariția unor semne de toxicitate severe și probabil moartea.

Afectarea fertilității reprezintă tulburări ale funcțiilor sau capacității de reproducere masculine sau feminine.

Toxicitate maternă efecte adverse asupra femelelor gestante, care apar fie în mod specific (efect direct), fie în mod nespecific (efect indirect) și sunt legate de situația de gestație.

NOAEL este abrevierea pentru nivelul la care nu se observă niciun efect advers. Acesta este cel mai ridicat nivel de dozare la care nu se observă efecte adverse din cauza tratamentului.

Estrogenicitatea este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon estrogen natural (de exemplu, estradiol 17ß) în organismul unui mamifer.

Toxicitate pentru reproducere reprezintă efecte dăunătoare asupra descendenților și/sau afectarea funcțiilor sau a capacității de reproducere masculine și feminine.

Substanță chimică de testat înseamnă orice substanță sau amestec testat(ă) utilizând această metodă de testare.

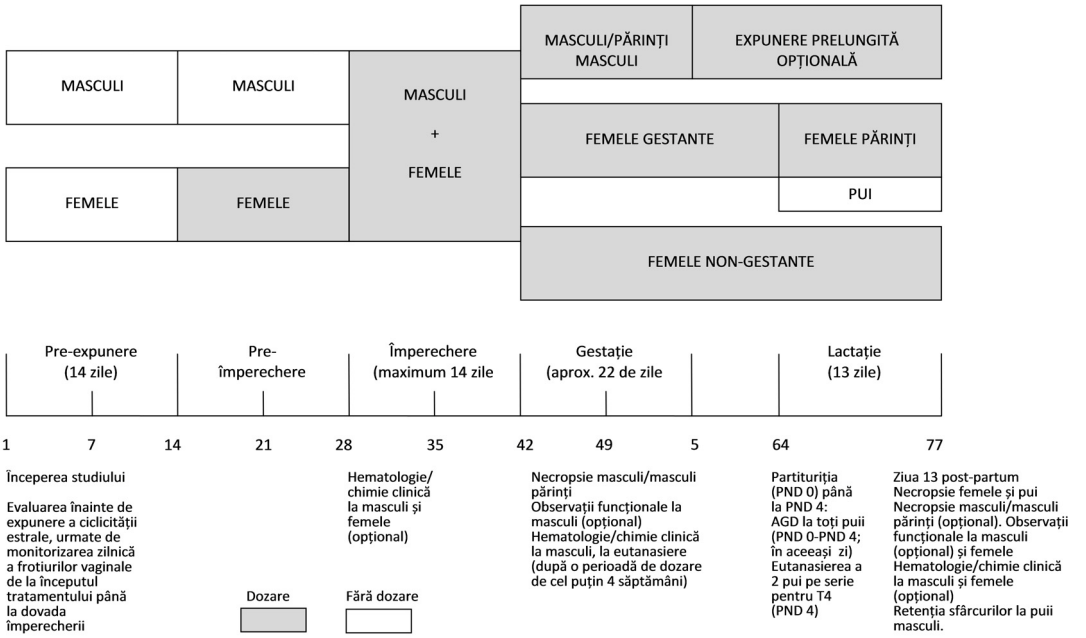
Activitatea tiroidiană este capacitatea unei substanțe chimice de a acționa ca hormon tiroidian natural (de exemplu, estradiol T_3) în organismul unui mamifer.

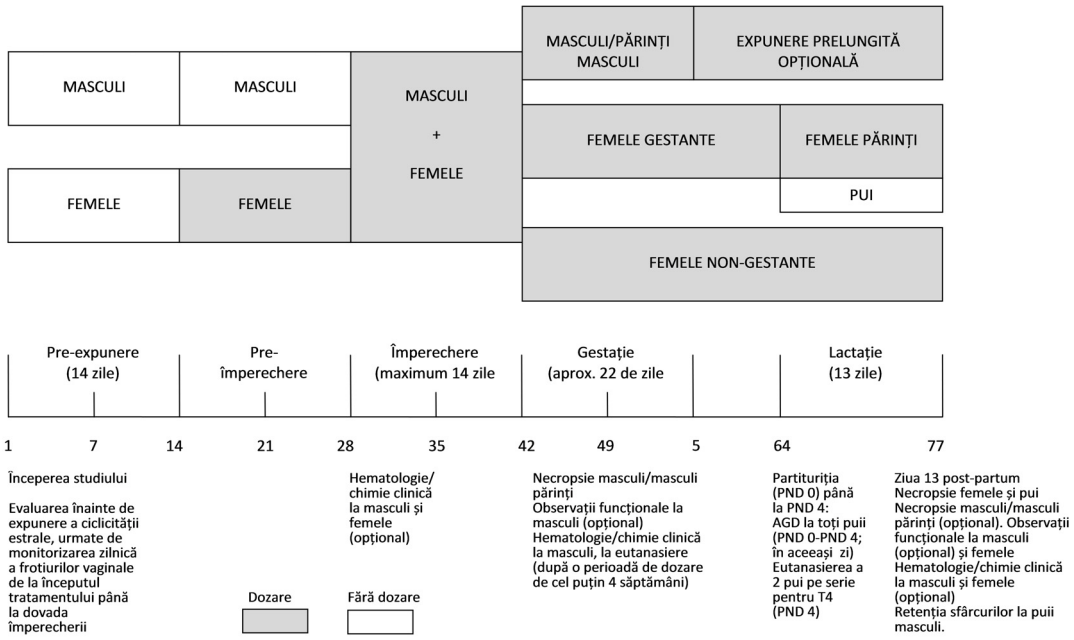
Validare înseamnă un proces științific conceput pentru a caracteriza cerințele și limitările operaționale ale unei metode de testare și pentru a demonstra fiabilitatea și relevanța acesteia pentru un anumit scop.

▼**M8**

Apendicele 2

DIAGRAMĂ A SCHEMEI DE TRATAMENT CARE INDICĂ DURATA MAXIMĂ A STUDIULUI, PE BAZA UNEI PERIOADE DE ÎMPERECHERE COMPLETE DE 14 ZILE





▼**M8**

Apendicele 3

RAPORT DE SINTEZĂ TABELAR CU EFECTELE ASUPRA REPRODUCERII/DEZVOLTĂRII

OBSERVAȚII	VALORI				
Dozaj (unități)	0 (martor)	…	…	…	…
Perechi începute (N)					
Ciclul estral (cel puțin durata medie și frecvența ciclurilor neregulate)					
Femele la care apare dovada copulației (N)					
Femele care au ajuns în gestație (N)					
Zile de concepție 1-5 (N)					
Zilele de concepție 6-... ([1]) (N)					
Sarcină≤21 de zile (N)					
Sarcină = 22 de zile (N)					
Sarcină ≥ 23 de zile (N)					
Femele cu pui născuți vii (N)					
Femele cu pui născuți vii în ziua 4 pp (N)					
Implanturi/femelă (media)					
Pui vii/femelă la naștere (media)					
Pui vii/femelă în ziua 4 (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) la naștere (media)					
Raportul dintre sexe (m/f) în ziua 4 (media)					
Greutatea seriei la naștere (media)					
Greutatea seriei în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor la naștere (media)					
Greutatea puilor în momentul măsurării AGD (media la masculi, media la femele)					
AGD a puilor în aceeași zi postnatală, la naștere - ziua 4 (media la masculi, media la femele, se notează PND)					
Greutatea puilor în ziua 4 (media)					
Greutatea puilor în ziua 13 (media)					

▼**M8**

OBSERVAȚII	VALORI				
Retenția sfârcurilor la pui masculi în ziua 13 (media)					
PUI ANORMALI					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu ≥ 2					
PIERDEREA PUILOR					
Prenatal (implantații minus născuți vii)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					
Postnatal (pui născuți vii minus pui vii în ziua postnatală 13)					
Femele cu 0					
Femele cu 1					
Femele cu 2					
Femele cu ≥ 3					

([1]) ultima zi a perioadei de împerechere

▼M8

B.65. METODA DE TESTARE *IN VITRO* PRIN BARIERĂ CU MEMBRANĂ PENTRU COROZIUNEA CUTANATĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 435 (2015). Corodarea pielii înseamnă producerea de leziuni ireversibile ale pielii, care se manifestă ca o necroză vizibilă ce pătrunde în *epidermă*, ajungând în *dermă*, în urma aplicării unei substanțe chimice de testat [astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1])]. Această metodă de testare, care este echivalentă cu orientarea nr. 435 a OCDE privind testarea actualizată asigură o metod de testare *in vitro* prin barieră de membrană care poate fi utilizată pentru identificarea substanțelor chimice corozive. Metoda de testare utilizează o membrană artificială prevăzută a răspunde la substanțe chimice corozive în mod similar pielii de animal *in situ*.

2. În mod tradițional, corozivitatea cutanată a fost evaluată prin aplicarea substanței chimice de testat pe pielea animalelor vii și prin evaluarea gradului de lezare a țesuturilor după o perioadă de timp determinată (2). În afară de prezenta metodă de testare, au fost adoptate o serie de alte metode de testare *in vitro* ca alternative (3) (4) la procedura standard *in vivo* pe piele de iepure (capitolul B.4 din prezenta anexă, echivalentă cu Orientarea TG nr. 404 a OCDE) utilizată pentru identificarea substanțelor chimice corozive (2). Strategia de testare și evaluare secvențială a GHS al ONU pentru evaluarea și clasificarea corozivității cutanate și Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (IATA) pentru iritație/coroziune cutanată recomandă utilizarea unor metode de testare *in vitro* validate și acceptate în cadrul modulelor 3 și 4 (1) (5). IATA descrie mai multe module care grupează surse de informații și instrumente de analiză și (i) oferă îndrumări cu privire la modul de integrare și utilizare a datelor existente privind testarea și alte date decât cele privind testarea pentru evaluarea potențialului de iritație cutanată și de coroziune cutanată al substanțelor chimice și (ii) propune o abordare atunci când sunt necesare teste suplimentare, inclusiv atunci când se identifică rezultate negative (5). În această abordare modulară, rezultatele pozitive ale metodelor de testare *in vitro* pot fi utilizate pentru clasificarea unei substanțe chimice ca fiind corozivă fără necesitatea testării pe animale, astfel fiind redusă și adaptată utilizarea animalelor în acest scop și evitându-se durerea și suferința care ar putea apărea la animale dacă acestea ar fi utilizate în acest scop.

3. Au fost realizate studii de validare pentru modelul de barieră cu membrană *in vitro*, care disponibil în comerț sub denumirea de Corrositex® (6) (7) (8), care indică o precizie generală de estimare a corozivității cutanate de 79 % (128/163), o sensibilitate de 85 % (76/89) și o specificitate de 70 % (52/74) pentru o bază de date cu 163 de substanțe și amestecuri (7). Pe baza valabilității sale recunoscute, această metodă de referință validată (MRV) a fost recomandată pentru utilizare în cadrul unei strategii de testare stratificate pentru evaluarea potențialului de pericol de coroziune cutanată al substanțelor chimice (5) (7). Înainte ca un model de barieră cu membrană *in vitro* pentru coroziunea cutanată să poată fi utilizat în scopuri de reglementare, ar trebui să se stabilească fiabilitatea, relevanța (precizia) și limitările acestuia pentru scopul propus, pentru a asigura faptul că acesta este similar MRV (9), în conformitate cu standardele de performanță prestabilite (SP) (10). Sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE va fi garantat numai după revizuirea și includerea în orientarea OCDE echivalentă privind testarea a

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

oricăror metode de testare noi sau actualizate propuse în urma standardelor de performanță. În prezent, doar o singură metodă *in vitro* este vizată de orientarea nr. 435 a OCDE privind testarea și prezenta metodă de testare, modelul disponibil în comerț Corrositex®.

4. Alte metode de testare pentru testarea corozivității cutanate se bazează pe utilizarea pielii umane reconstituite (orientarea TG nr. 431 a OCDE) (3) și a pielii izolate de șobolan (orientarea TG nr. 430 a OCDE) (4). Această orientare privind testarea prevede, de asemenea, subclasificarea substanțelor chimice corozive în cele trei subcategorii de corozivitate din GHS al ONU și în cele trei grupuri de ambalaje pentru transport ale ONU pentru pericole de corozivitate. Această orientare OCDE privind testarea a fost adoptată inițial în 2006 și actualizată în 2015 pentru a face trimitere la documentul de orientare IATA și a actualiza lista substanțelor de verificare.

DEFINIȚII

5. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

6. Testul descris în prezenta metodă de testare permite identificarea substanțelor chimice corozive și permite subclasificarea substanțelor chimice de testat corozive în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (tabelul 1). În plus, o astfel de metodă de testare poate fi utilizată pentru a lua decizii privind caracterul coroziv și necoroziv al anumitor clase de substanțe chimice, de exemplu, acizi organici și anorganici, derivați ai acizilor [1] și baze pentru anumite scopuri de testare la transport (7) (11) (12). Prezenta metodă de testare descrie o procedură generică similară cu metoda de testare de referință validată (7). Deși această metodă de testare nu oferă informații adecvate privind iritația cutanată, ar trebui remarcat faptul că MT B.46 (echivalentă cu orientarea TG nr. 439 a OCDE) abordează în mod specific efectul iritației cutanate *in vitro*asupra sănătății (13). Pentru o evaluare completă a efectelor cutanate locale după o singură expunere a dermei, ar trebui să se consulte Documentul de orientare al OCDE privind metodele integrate de testare și evaluare (5).

Tabelul 1

Categoria și subcategoriile de substanțe corozive pentru piele din GHS al ONU [1]

Categoria de substanțe corozive (categoria 1) (pentru autoritățile care nu utilizează subcategorii)	Subcategorii de substanțe potențial corozive [1] (pentru autoritățile care utilizează subcategorii, inclusiv Regulamentul CLP)	Coroziv la ≥ 1 din 3 animale	
		Expunere	Observație
Coroziv	Subcategoria de substanțe corozive 1A	≤ 3 minute	≤ 1 oră
	Subcategoria de substanțe corozive 1B	> 3 minute/≤ 1 oră	≤ 14 zile
	Subcategoria de substanțe corozive 1C	> 1 oră/≤ 4 ore	≤ 14 zile

[1] Pentru UE, Regulamentul CLP aplică cele trei subcategorii de substanțe corozive pentru piele 1A, 1B și 1C.

7. O limitare a metodei de referință validate (7) este aceea că este posibil ca multe substanțe chimice necorozive și anumite substanțe chimice corozive să nu îndeplinească cerințele pentru a fi testate, pe baza rezultatelor testului de compatibilitate inițial (a se vedea punctul 13). Substanțele chimice apoase cu

[1] „Derivat de acid” este o denumire de clasă nespecifică și este definit, în general, ca fiind o substanță chimică produsă dintr-un acid, fie în mod direct, fie prin modificare sau înlocuire parțială. Această clasă include anhidridele, acizii halogenați, sărurile și alte tipuri de substanțe chimice.

▼M8

un pH cuprins în intervalul 4,5-8,5 nu îndeplinesc, de cele mai multe ori, cerințele pentru testare; însă, 85 % dintre substanțele chimice de testat în acest interval de pH au fost necorozive la testele pe animale (7). Metoda barierei cu membrană *in vitro* poate fi utilizată pentru testarea substanțelor solide (solubile sau insolubile în apă) și lichide (apoase sau neapoase) și a emulsiilor. Însă, substanțele chimice de testat care nu cauzează o modificare detectabilă în cadrul testului de compatibilitate (și anume, modificarea culorii în sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS) al metodei de testare de referință validate) nu pot fi testate prin metoda barierei cu membrană și ar trebui să fie testate folosind alte metode de testare.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Sistemul de testare cuprinde două componente: o biobarieră macromoleculară sintetică și un sistem de detectare a substanțelor chimice (CDS); prin această metodă de testare se detectează, prin intermediul barierei de membrană CDS, leziunile provocate de substanțele chimice de testat corozive după aplicarea substanței chimice de testat pe suprafața barierei de membrană macromoleculară sintetică (7), probabil prin același același mecanism(e) de coroziune care funcționează pe piele vie.

9. Penetrarea (sau perforarea) barierei de membrană ar putea fi măsurată printr-o serie de proceduri sau CDS, inclusiv o schimbare a culorii unui colorant indicator al pH-ului sau a unei alte proprietăți a soluției indicatoare sub barieră.

10. Bariera de membrană ar trebui să fie determinată ca fiind validă, și anume, relevantă și fiabilă pentru scopul prevăzut. Aceasta include asigurarea faptului că diferite preparate sunt consecvente în ceea ce privește proprietățile de barieră, de exemplu, că acestea sunt capabile să mențină o barieră în calea substanțelor chimice necorozive, să clasifice proprietățile corozive ale substanțelor chimice în diferitele subcategorii de corozivitate din GHS al ONU (1). Clasificarea atribuită se bazează pe timpul în care o substanță chimică pătrunde prin bariera de membrană în soluția indicatoare.

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

11. Înainte de utilizarea sistematică a metodei cu barieră de membrană *in vitro*, cu respectarea acestei metode de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor douăsprezece substanțe de verificare recomandate în tabelul 2. În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate [de exemplu, din lista de substanțe chimice de referință (10)], cu condiția să se aplice aceleași criterii de selecție, astfel cum sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 2

Substanțe de verificare [1]

Substanță [2]	NR CAS	Clasă chimică	Subcategoria din GHS al ONU *in vivo* [3]	Subcategoria din GHS al ONU *in vitro* [3]
Trifluorură de bor, dihidrat	13319-75-0	Acizi anorganici	1A	1A
Acid nitric	7697-37-2	Acizi anorganici	1A	1A
Pentaclorură de fosfor	10026-13-8	Precursori ai acizilor anorganici	1A	1A
Clorură de valeril	638-29-9	Cloruri de acil	1B	1B
Hidroxid de sodiu	1310-73-2	Baze anorganice	1B	1B

▼M8

Substanță ([2])	NR CAS	Clasă chimică	Subcategoria din GHS al ONU *in vivo* ([3])	Subcategoria din GHS al ONU *in vitro* ([3])
1-(2-aminoetil)piperazină	140-31-8	Amine alifatice	1B	1B
Clorură de benzensulfonil	98-09-9	Cloruri de acil	1C	1C
N, N-Dimetil-benzilamină	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraetilenpentamină	112-57-2	Amine alifatice	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Acrilat de nonil	2664-55-3	Acrilați/metacrilați	NC	NC
Bicarbonat de sodiu	144-55-8	Săruri anorganice	NC	NC

([1]) Cele douăsprezece substanțe enumerate mai sus conțin trei substanțe din fiecare dintre cele trei subcategorii ale GHS al ONU pentru substanțe corozive și trei substanțe necorozive, sunt disponibile imediat în comerț, iar subcategoria din GHS al ONU se bazează pe rezultatele testelor *in vivo* de înaltă calitate. Aceste substanțe sunt preluate din lista de 40 de substanțe de referință care sunt incluse în lista minimală de substanțe chimice identificate pentru a demonstra precizia și fiabilitatea metodelor de testare care sunt similare din punct de vedere structural și funcțional cu metoda de testare de referință validată, fiind selectate dintre cele 163 de substanțe chimice de referință utilizate inițial pentru validarea metodei de testare de referință (Corrositex®) (7) (10) (14). Obiectivul acestui proces de selecție urma să includă, în măsura posibilității, substanțele chimice care: au fost reprezentative pentru gama de răspunsuri privind corozivitatea (de exemplu, substanțe necorozive; substanțele corozive din grupurile de ambalaje I, II și III ale ONU) pe care metoda de testare de referință validată le poate măsura sau prezice; au fost reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în procesul de validare; au structuri chimice care au fost bine definite; au indus rezultate reproductibile în metoda de testare de referință validată; au indus rezultate definitive în testul de referință *in vivo*; au fost disponibile în comerț; și nu sunt asociate cu costuri de eliminare prohibitive (14).

([2]) Substanțe testate ca fiind în stare pură sau cu o puritate de ≥ 90 %

([3]) Grupurile de ambalaje aferente conform ONU sunt I, II și, respectiv, III pentru subcategoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU. NC; Necoroziv.

PROCEDURA

12. Punctele următoare descriu componentele și procedurile unei metode de testare cu barieră de membrană artificială pentru evaluarea corozivității (7) (15), pe baza actualei MRV, și anume, Corrositex®, care este disponibilă în comerț. Bariera de membrană și soluțiile de compatibilitate/indicare și clasificare pot fi proiectate, preparate sau obținute din comerț, cum ar fi în cazul MRV Corrositex®. Există un model de protocol al metodei de testare pentru metoda de testare de referință validată (7). Testele ar trebui să fie efectuate la temperatura ambiantă (17-25 °C), iar componentele ar trebui să respecte următoarele condiții.

Testul de compatibilitate al substanței chimice de testat

13. Înainte de efectuarea testului cu barieră de membrană, se efectuează un test de compatibilitate pentru a determina dacă substanța chimică de testat poate fi detectată de CDS. În cazul în care CDS nu detectează substanța chimică de testat, metoda de testare cu barieră de membrană nu este adecvată pentru evaluarea corozivității potențiale a respectivei substanțe chimice de testat respective și ar trebui să fie utilizată o altă metodă de testare. CDS și condițiile de expunere utilizate pentru testul de compatibilitate ar trebui să reflecte expunerea în cadrul testului ulterior cu barieră de membrană.

Testul de clasificare a substanțelor chimice după timp

14. Dacă este cazul, pentru metoda de testare, o substanță chimică de testat care a fost calificată în urma testului de compatibilitate ar trebui să fie supusă unui test de clasificare după timp, și anume, un test de depistare care face diferența între acizi sau baze slabe și puternice. De exemplu, în cadrul metodei de testare de referință validate se utilizează un test de clasificare după timp pentru indicarea uneia dintre cele două durate care ar trebui

▼M8

folosită, în funcție de detectarea unei rezerve acide sau alcaline semnificative. Ar trebui să se utilizeze doi timpi diferiți de pătrundere pentru determinarea corozivității și a subcategoriei de corozivitate pentru piele a GHS al ONU, în funcție de rezerva acidă sau alcalină a substanței chimice de testat.

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE CU BARIERĂ DE MEMBRANĂ

Bariera de membrană

15. Bariera de membrană cuprinde două componente: un gel apos macromolecular proteinic și o membrană de susținere permeabilă. Gelul proteinic ar trebui să fie impermeabil la lichide și solide, dar poate să fie corodat și să devină permeabil. Bariera de membrană construită integral ar trebui să fie păstrată în condiții prestabilite care sunt dovedite a împiedica deteriorarea gelului, de exemplu, uscarea, creșterea microbiană, schimbarea, crăparea, care ar degrada performanțele acesteia. Ar trebui să se stabilească perioada de păstrare acceptabilă, iar preparatele barierei de membrană nu nu ar trebui să fie utilizate după această perioadă.

16. Membrana de susținere permeabilă asigură o susținere mecanică pentru gelul proteinic în timpul procesului de coagulare și de expunere la substanța chimică de testat. Membrana de susținere ar trebui să împiedice acumularea sau deplasarea gelului și să fie ușor permeabilă la toate substanțele chimice de testat.

17. Gelul proteinic, care este compus din proteine, de exemplu, cheratină, colagen sau amestecuri de proteine, și care formează o matrice de gel, servește drept obiectiv pentru substanța chimică de testat. Materialul proteinic este plasat pe suprafața membranei de susținere și lăsat să se coaguleze înainte de a așeza bariera de membrană peste soluția indicator. Gelul proteinic ar trebui să aibă o grosime și o densitate uniformă, fără bule de aer sau defecte care ar putea afecta integritatea sa funcțională.

Sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS)

18. Soluția indicator, care este aceeași soluție utilizată pentru testul de compatibilitate, ar trebui să reacționeze la prezența unei substanțe chimice de testat. Ar trebui să se utilizeze un colorant sau o combinație de coloranți indicatori ai pH-ului, de exemplu, roșu crezol și portocaliu de metil, care vor prezenta o modificare a culorii, ca răspuns la prezența substanței chimice de testat. Sistemul de măsurare poate fi vizual sau electronic.

19. Sistemele de detectare care sunt dezvoltate pentru detectarea trecerii substanței chimice de testat prin bariera de membrană ar trebui să fie evaluate pentru relevanță și fiabilitate în vederea demonstrării gamei de substanțe chimice care pot fi detectate și a limitelor cantitative de detecție.

PERFORMANȚA TESTULUI

Asamblarea componentelor metodei de testare

20. Bariera de membrană este introdusă într-un flacon (sau o eprubetă) care conține soluția indicator, astfel încât membrana de susținere să fie cu totul în contact cu soluția indicator și să nu se formeze bule de aer. Ar trebui să se acorde atenție pentru a asigura menținerea integrității barierei.

▼M8

Aplicarea substanței chimice de testat

21. O cantitate adecvată de substanță chimică de testat, de exemplu, 500 µl dintr-un lichid sau 500 mg de substanță solidă sub formă de pulbere (7), se așează cu atenție pe suprafața superioară a barierei de membrană și se distribuie uniform. Pentru fiecare substanță chimică de testat și martorii aferenți se pregătește un număr adecvat de duplicate, de exemplu patru (7) (a se vedea punctele 23-25). Se înregistrează timpul de aplicare a substanței chimice de testat pe bariera de membrană. Pentru a asigura înregistrarea cu precizie a timpilor scurți de coroziune, timpii de aplicare a substanței chimice de testat în flacoanele duplicate sunt stabiliți separat.

Măsurarea gradului de pătrundere în bariera de membrană

22. Fiecare flacon este monitorizat în mod corespunzător și se înregistrează timpul primei modificări a soluției indicator, și anume, pătrunderea în barieră, determinându-se timpul scurs între aplicare și pătrunderea în bariera de membrană.

Martori

23. La testele care implică utilizarea unui vehicul sau a unui solvent cu substanța chimică de testat, vehiculul sau solventul respectiv ar trebui să fie compatibil cu sistemul barierei de membrană, și anume, să nu modifice integritatea acestui sistem, și nu ar trebui să modifice corozivitatea substanței chimice de testat. După caz, martorul tratat cu solvent (sau cu vehicul) ar trebui să fie testat concomitent cu substanța chimică de testat pentru a demonstra compatibilitatea solventului cu sistemul barierei de membrană.

24. Concomitent cu substanța chimică de testat ar trebui să se testeze un martor pozitiv (coroziv) cu o activitate de corozivitate intermediară, de exemplu, 110 ± 15 mg hidroxid de sodiu (subcategoria de substanțe corozive 1B din GHS al ONU) (7) pentru a evalua dacă sistemul de testare funcționează într-un mod acceptabil. Un al doilea martor pozitiv care este din aceeași clasă chimică ca și substanța chimică de testat poate fi util pentru evaluarea potențialului de corozivitate relativă al unei substanțe chimice de testat corozive. Ar trebui să se aleagă un martor(i) pozitiv(i) cu o corozivitate intermediară (de exemplu, din subcategoria 1B din GHS al ONU) pentru a detecta modificările apărute în timpul de pătrundere care ar putea fi inacceptabil de prelungit sau mai scurt decât valoarea de referință stabilită, ceea ce indică faptul că sistemul de testare nu funcționează în mod corect. În acest scop, substanțele chimice extrem de corozive (subcategoria 1A din GHS al ONU) sau cele necorozive au o utilitate limitată. O substanță chimică corozivă din subcategoria 1B din GHS al Națiunilor Unite ar permite detectarea unui timp de pătrundere prea scurt sau prea mare. O substanță slab corozivă (din subcategoria 1C din GHS al ONU) ar putea fi utilizată ca martor pozitiv pentru măsurarea capacității metodei de testare de a face distincția în mod consecvent între substanțele chimice slab corozive și cele necorozive. Indiferent de metoda utilizată, ar trebui să se dezvolte un interval de răspuns acceptabil al martorilor pozitivi pe baza intervalului istoric al timpilor de pătrundere pentru martorul (martorii) pozitiv(i) utilizați, cum ar fi media ± 2-3 abateri standard. Ar trebui să se determine, în cadrul fiecărui studiu, timpul exact de pătrundere pentru martorul pozitiv, astfel încât să se poată detecta abaterile din afara intervalului acceptabil.

25. De asemenea, ar trebui să se testeze, concomitent cu substanța chimică de testat, un martor negativ (necoroziv), de exemplu, 10 % acid citric, 6 % acid propionic (7), ca o altă măsură de control al calității pentru a demonstra integritatea funcțională a barierei de membrană.

▼M8

Criterii de acceptare a studiului

26. Conform parametrilor de timp stabiliți pentru fiecare subcategorie de corozivitate din GHS al ONU, timpul (în minute) care s-a scurs între aplicarea unei substanțe chimice de testat pe bariera de membrană și pătrunderea în barieră se folosește pentru a prezice corosivitatea substanței chimice de testat. Pentru ca un studiu să fie considerat acceptabil, martorul pozitiv testat în paralel ar trebui să indice timpul de răspuns prevăzut pentru pătrundere (de exemplu, un timp de pătrundere de 8-16 minute pentru hidroxidul de sodiu dacă acesta este utilizat ca martor pozitiv), martorul negativ testat în paralel nu ar trebui să fie coroziv și, dacă este inclus, martorul tratat cu solvent testat în paralel nu ar trebui nici să fie coroziv, nici să modifice potențialul de corozivitate al substanței chimice de testat. Înainte de utilizarea sistematică a unei metode care respectă prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele sale tehnice, utilizând cele douăsprezece substanțe recomandate în tabelul 2. Pentru metode noi de tipul „me-too” dezvoltate în cadrul acestei metode de testare, care sunt similare din punct de vedere structural și funcțional cu metoda de referință validată (14), standardele de performanță predefinite ar trebui să fie utilizate pentru a demonstra fiabilitatea și precizia noii metode înainte ca aceasta să fie utilizată pentru testarea de reglementare (10).

Interpretarea rezultatelor și clasificarea substanțelor chimice de testat în funcție de corozivitate

27. Timpul (în minute) scurs între aplicarea substanței chimice de testat pe bariera de membrană și pătrunderea acesteia în barieră este utilizat pentru a clasifica substanța chimică de testat în subcategoriile de substanțe corozive din GHS al ONU (1) și, dacă este cazul, în grupul de ambalaje al ONU (16). Valoril timpului-limită pentru fiecare dintre cele trei subcategorii de substanțe corozive sunt stabilite pentru fiecare metodă de testare propusă. Deciziile finale privind timpul-limită ar trebui să ia în considerare necesitatea de a reduce la minimum subclasificarea pericolului coroziv (și anume, valorile fals negative). În prezenta orientare privind testarea, ar trebui să fie utilizate valorile timpului-limită ale Corrositex®, astfel cum sunt descrise în tabelul 3, deoarece aceasta constituie singura metodă de testare care se încadrează în prezent în orientarea privind testare (7).

Tabelul 3

Modelul predictiv Corrositex®

Timpul mediu de pătrundere (min.)		Predicția GHS al ONU ([3])
Substanțele chimice de testat din categoria 1 ([1]) (determinate prin testul de clasificare al metodei)	Substanțele chimice de testat din categoria 2 ([2]) (determinate prin testul de clasificare al metodei)	
0-3 min.	0-3 min.	Coroziv subcategoria 1A opțională
> 3-60 min.	> 3-30 min.	Coroziv subcategoria 1B opțională
> 60-240 min.	> 30-60 min.	Coroziv subcategoria 1C opțională
> 240 min.	> 60 min.	Necoroziv

([1]) Substanțe chimice de testat cu rezervă acidă/alcalină ridicată (6)
([2]) Substanțe chimice de testat cu rezervă acidă/alcalină redusă (6)
([3]) Subcategoriile 1A, 1B și 1C din GHS al ONU corespund grupurilor de ambalaje I, II și III ale ONU.

▼**M8**

DATE ȘI RAPORTARE

Date

28. Timpul (în minute) scurs între aplicare și pătrunderea în barieră, în cazul substanței chimice de testat și al martorului (martorilor) pozitiv(i), ar trebui să fie consemnat într-un tabel, ca date individuale duplicate, precum și ca medie ± abaterea standard pentru fiecare test.

Raport testului

29. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanță mono-constituent: identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— sursa, numărul lotului, dacă există;

— tratamentul substanțelor chimice de testat/martor înainte de efectuarea testului, după caz (de exemplu, încălzire, măcinare);

— stabilitatea substanței chimice de testat, data limită de utilizare sau data pentru reanalizare, dacă se cunoaște;

— condiții de depozitare.

Vehicul:

— identificare, concentrație (dacă este cazul), volumul utilizat;

— justificarea alegerii vehiculului.

Modelul barierei de membrană in vitro și protocolul utilizat, inclusiv precizia și fiabilitatea demonstrate

Condiții de testare:

— descrierea aparaturii și a procedurilor de preparare utilizate;

— sursa și compoziția barierei de membrană *in vitro* utilizate;

— compoziția și proprietățile soluției indicator;

— metoda de detecție;

— cantitățile de substanțe chimice de testat și de substanțe martor;

— numărul duplicatelor;

— descrierea și justificarea testului de clasificare după timp;

▼**M8**

— metoda de aplicare;

— timpii de observație.

— descrierea criteriilor de evaluare și de clasificare aplicate;

— demonstrarea competenței de desfășurare a metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor chimice de verificare.

Rezultate:

— prezentarea sub formă tabelară a datelor brute individuale obținute din probe individuale de testare și martori pentru fiecare duplicat;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), a cincea ediție revizuită, ONU New York și Geneva, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Capitolul B.4 din prezenta anexă, Iritație/coroziune cutanată acută.

(3) Capitolul B.40bis din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: metoda de testare pe epidermă umană reconstruită (RHE).

(4) Capitolul B.40 din prezenta anexă, Coroziune cutanată *in vitro*: Rezistența electrică transcutanată (RET).

(5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 203). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. și Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (nr. 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. și Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (nr. 34).

(10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italia. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (a cincea revizie). (20 septembrie 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capitolul B.46 din prezenta anexă, Iritația cutanată *in vitro*: Metoda de testare pe epidermă umană reconstruită. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication nr. 04-4510. Publicație disponibilă la adresa: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Publicație disponibilă la adresa: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, a 18-a ediție revizuită (partea, capitolul 2.8), UN, 2013. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Anexă

DEFINIȚII

Acuratețe: Gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul sinonim „concordanță”, pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (9).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Sistemul de detectare a substanțelor chimice (CDS): Un sistem de măsurare vizuală sau electronică cu o soluție indicator care răspunde la prezența unei substanțe chimice de testat, de exemplu, printr-o modificare a unui colorant indicator de pH sau a unei combinații de coloranți, care va indica o schimbare de culoare ca răspuns la prezența substanței chimice de testat sau ca urmare a altor tipuri de reacții chimice sau electrochimice.

Concordanță: Este un indicator al performanței metodei de testare pentru metodele de testare care oferă un rezultat categoric și este unul dintre aspectele relevante ale acesteia. Termenul este uneori utilizat în paralel cu termenul „acuratețe” și este definit ca proporție a tuturor substanțelor chimice testate și clasificate corect ca fiind pozitive sau negative. Concordanța depinde foarte mult de prevalența pozitivelor în tipurile de substanțe chimice de testat supuse examinării (9).

GHS (Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice):: Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

IATA: Strategie integrată pentru testare și evaluare.

Amestec: Un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

NC: Necoroziv.

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de referință validată, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Sunt incluse (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) niveluri similare de fiabilitate și acuratețe, bazate pe datele obținute pentru metoda de testare validată, pe care metoda de testare propusă ar trebui să le demonstreze în momentul evaluării acesteia utilizându-se lista minimă de substanțe chimice de referință (9).

▼**M8**

Relevanță: Descrierea relației dintre metoda de testare și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care metoda de testare măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (9).

Fiabilitate: Măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității intra-laborator sau inter-laborator (9).

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Coroziunea cutanată *in vivo*: Producerea unor leziuni cutanate ireversibile; și anume, necroză vizibilă prin epidermă și în dermă, ca urmare a aplicării unei substanțe chimice de testat timp de până la patru ore. Reacțiile cutanate se manifestă, în general, prin ulcere, sângerare, cruste sângerânde, și, spre sfârșitul perioadei de observație de 14 zile, o decolorare datorată albirii pielii, zone de alopecie completă și cicatrice. Pentru evaluarea leziunilor incerte ar trebui să se aibă în vedere efectuarea unui examen histopatologic.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect prin metoda de testare. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (9).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼M8

B.66. TESTE *IN VITRO* DE TRANSACTIVARE CU TRANSFECTARE STABILĂ PENTRU DETECTAREA AGONIȘTILOR ȘI ANTAGONIȘTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

INTRODUCERE GENERALĂ

Orientarea OCDE privind testarea pe baza performanței

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 455 (2016). TG nr. 455 este o orientare privind testarea pe baza performanței (PBTG), care descrie metodologia testelor *in vitro* de transactivare cu transfectare stabilă pentru detectarea agoniștilor și a antagoniștilor receptorilor de estrogen (testele ER TA). Aceasta cuprinde mai multe metode de testare similare din punct de vedere mecanicist și funcțional pentru identificarea agoniștilor și antagoniștilor receptorilor de estrogen (și anume, ERα și/sau ERβ) și ar trebui să faciliteze dezvoltarea unor metode de testare similare noi sau modificate în conformitate cu principiile de validare prevăzute în documentul de orientare al OCDE privind validarea și acceptarea internațională a metode de testare noi și actualizate pentru evaluarea riscurilor (1). Metodele de testare de referință validate integral (apendicele 2 și apendicele 3), care servesc drept bază pentru această PBTG, sunt:

— Testul AT cu transfectare stabilă (STTA) (2) care utilizează linia celulară (h) ERα-HeLa-9903; și

— Testul VM7Luc ER AT (3), care utilizează linia celulară VM7Luc4E2 ([1]), care exprimă predominant hERα cu o oarecare contribuție din partea hERβ(4) (5).

Pentru dezvoltarea și validarea unor teste similare pentru același punct final de pericol există standarde de performanță (SP) (6) (7) care ar trebui să fie utilizate. Acestea permit modificarea prpomptă a PBTG nr. 455, astfel încât să se poată adăuga teste similare noi la o PBTG actualizată; însă testele similare vor fi adăugate doar după revizuirea și confirmarea de către OCDE a respectării standardelor de performanță. Testele incluse în TG nr. 455 pot fi utilizate fără nicio deosebire pentru a răspunde cerințelor statelor membre ale OCDE pentru rezultatele testelor privind transactivarea receptorilor de estrogen, beneficiind în același timp de sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE.

Context și principii ale testelor incluse prezenta metodă de testare

2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente privind testarea și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a

([1]) Înainte de iunie 2016, această linie celulară a fost desemnată drept linia celulară BG1Luc. Celulele BG-1 au fost inițial descrise de Geisinger et al. (1998) (35) și au fost caracterizate ulterior de cercetători din cadrul Institutului Național de Științe ale Sănătății Mediului (NIEHS) (36). Relativ recent, s-a descoperit că există două variante diferite de celule BG-1 utilizate de cercetători, și anume, BG-1 Fr și BG-1 NIEHS. O analiză aprofundată, inclusiv o testare ADN, a acestor două linii celulare variante BG-1, care a fost efectuată de Li și colaboratorii (2014) (37), a arătat că BG-1 Fr este unică și că BG-1 NIEHS, adică linia celulară inițială utilizată pentru test, nu era linia celulară BG1 de carcinom ovarian la om, ci era, în schimb, o variantă a liniei celulare MCF7 de cancer de sân la om. Linia celulară utilizată în cadrul testului, denumită inițial BG1Luc4E2 (38), va fi denumită acum VM7Luc4E2 („V” = variantă; „M7” = celule MCF7). De asemenea, testul va fi denumit acum VM7Luc ER TA. Deși prin aceasta se modifică originea liniei celulare pe care se bazează testul, acest lucru nu afectează studiile de validare publicate și nici utilitatea și aplicarea acestui test pentru depistarea substanțelor chimice estrogenice/anti-estrogenice.

▼**M8**

sistemului endocrin. Cadrul conceptual al OCDE (CC) pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin a fost revizuit în 2012. Cadrele conceptuale inițiale și revizuite sunt incluse ca anexe la documentul de orientare al OCDE privind orientările de testare standardizate pentru evaluarea substanțelor chimice în vederea identificării perturbatorilor endocrini (8). CC cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică. Testele de transactivare ER (AT) descrise în această metodă de testare sunt de nivelul 2, care include *teste in vitro care furnizează date cu privire la (un) anumit(e) mecanism(e)/o cale endocrină/anumite căi endocrine.* Această metodă de testare este pentru teste *in vitro* de transactivare (AT) concepute pentru a identifica agoniștii și antagoniștii receptorilor de estrogen (ER).

3. Interacțiunea estrogenilor cu ER poate afecta transcrierea genelor controlate de estrogen, ceea ce poate conduce la inducerea sau inhibarea proceselor celulare, inclusiv a celor necesare pentru proliferare celulară, dezvoltare normală a fătului și funcția de reproducere (9) (10) (11). Perturbarea sistemelor estrogenice normale poate avea potențialul de a declanșa efecte adverse asupra dezvoltării normale (ontogeneză), a sănătății reproductive și a integrității sistemului de reproducere.

4. Testele TA *in vitro* se bazează pe o interacțiune directă sau indirectă a substanțelor cu un receptor specific care reglează transcrierea unui produs genetic reporter. Astfel de teste au fost utilizate pe scară largă pentru a evalua expresia genică reglementată de anumiți receptori nucleari, cum ar fi ER (12) (13) (14) (15) (16). Acestea au fost propuse pentru detectarea transactivării estrogenice reglementate de ER (17) (18) (19). Există cel puțin două subtipuri majore de ER nucleari, α și β, care sunt codificați prin gene distincte. Proteinele respective au diferite funcții biologice, precum și diferite distribuții de țesuturi și afinități de legare a liganzilor (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). ERα nuclear mediază răspunsul estrogenic clasic (27) (28) (29) (30) și, prin urmare, cele mai multe modele în curs de elaborare pentru a măsura activarea sau inhibarea ER sunt specifice ERα. Testele sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice care activează (sau inhibă) ER în urma legării lianzilor, după care complexul receptor-ligand se leagă de anumite elemente de răspuns ADN specifice și transactivează o genă reporter, ceea ce determină creșterea expresiei celulare a unei proteine marker. În aceste teste pot fi utilizate diferite răspunsuri ale reporterilor. În sistemele bazate pe luciferază, enzima luciferază transformă substratul luciferină într-un produs bioluminiscent care poate fi măsurat cantitativ cu un luminometru. Alte exemple de reporteri comuni sunt proteina fluorescentă și gena *LacZ*, care codifică β-galactozidaza, o enzimă care poate transforma substratul incolor X-gal (5-bromo-4-cloro-indol-galactopiranozidă) într-un produs de culoare albastră care poate fi cuantificat cu un spectrofotometru. Acești reporteri pot fi evaluați rapid și cu costuri reduse cu ajutorul unor truse de testare disponibile în comerț.

5. Studiile de validare a testelor STTA și VM7Luc TA și-au demonstrat relevanța și fiabilitatea acestora pentru scopul prevăzut (3) (4) (5) (30). Standardele de performanță pentru testele ER TA bazate pe luminiscență, care folosesc linii celulare din sân, sunt incluse în raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM privind metoda de testare LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Aceste standarde de performanță au fost modificate pentru a fi aplicabile în cazul testelor STTA și VM7Luc TA (2).

6. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

▼M8

Domeniul de aplicare și limitările aferente testelor TA

7. Aceste teste sunt propuse pentru depistare și stabilirea priorităților, dar pot furniza, de asemenea, informații mecaniciste care pot fi utilizate în cadrul unei abordări bazate pe dovezi. Acestea abordează TA indusă de legarea substanței chimice de ER într-un sistem *in vitro*. Astfel, rezultatele nu ar trebui să fie extrapolate în mod direct cu semnalizarea și reglarea complexă a sistemului endocrin *in vivo*.

8. TA mediată de ER este considerată a fi unul dintre principalele mecanisme de perturbare a sistemului endocrin (ED), deși există și alte mecanisme prin care se poate produce ED, inclusiv (i) interacțiunile cu alți receptori și sisteme enzimatice din sistemul endocrin, (ii) sinteza hormonilor, (iii) activarea metabolică și/sau inactivarea hormonilor, (iv) distribuirea hormonilor la țesuturile țintă și (v) eliminarea hormonilor din corp. Niciunul dintre testele efectuate în cadrul acestei metode de testare nu abordează aceste moduri de acțiune.

9. Această metodă de testare abordează capacitatea substanțelor chimice de a activa (și anume, de a acționa ca agoniștii) și, de asemenea, de a suprima (și anume, de a acționa ca antagoniști) transcrierea dependentă de ER. Unele substanțe chimice pot, într-o manieră dependentă de tipurile de celule, să afișeze atât activitatea agonistă, cât și activitatea antagonistă și sunt cunoscute sub denumirea de modulatori de receptori de estrogen selectivi (SERM). Substanțele chimice negative din aceste teste ar putea fi evaluate în cadrul unui test de legare de ER înainte de a concluziona că substanța chimică nu se leagă de receptor. În plus, este posibil ca testele să ofere informații numai despre activitatea moleculei mamă, ținând seama de capacitatea de metabolizare limitată a sistemelor de celule *in vitro*. Având în vedere că, în timpul validării, au fost utilizate numai substanțe unice, aplicabilitatea pentru amestecuri de testare nu a fost abordată. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere teoretic pentru testarea substanțelor multicomponente, a UVCB și a amestecurilor. Înainte de utilizarea metodei de testare pe o substanță multicomponentă, UVCB sau un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

10. În scop informativ, tabelul 1 prezintă rezultatele testului de agoniști pentru cele 34 de substanțe care au fost testate în cadrul ambelor metode de testare de referință validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 26 sunt clasificate ca fiind agoniști ER definitivi și 8 negative pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a testelor *in vitro* pentru legarea de ER și TA, precum și/sau a testului uterotrophic (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Tabelul 2 prezintă rezultatele testului de antagoniști pentru cele 15 substanțe care au fost testate în cadrul ambelor metode de testare de referință validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 4 sunt clasificate ca fiind antagoniști ER definitivi/presupuși și 10 negative pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a testelor *in vitro* pentru legarea de ER și TA (2) (3) (18) (31). În ceea ce privește datele sintetizate în tabelele 1 și 2, s-a ajuns la un acord de 100 % între cele două metode de testare de referință privind clasificările tuturor substanțelor, cu excepția unei substanțe (Mifepristonă) pentru testul antagonist și fiecare substanță a fost clasificată în mod corect ca agonist/antagonist ER sau negativă. Informații suplimentare privind acest grup de substanțe chimice, precum și alte substanțe chimice testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA în timpul studiilor de validare sunt prezentate în standardele de performanță pentru ERTA (6) (7), apendicele 2 (tabelele 1, 2 și 3).

▼M8

Tabelul 1

Prezentarea rezultatelor testelor STTA și VM7Luc ER TA pentru substanțele testate în cadrul ambelor teste privind agoniștii și clasificate ca reprezentând agoniști ER (POS) sau negative (NEG)

	Substanță	NR CAS	Testul STTA (1)			Testul VM7Luc ER TA (2)		Sursa datelor pentru clasificare (4)		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} (b) (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} (b), (3) (M)	Alte ER TA (c)	Legare de ER	Uterotrofică
1	17ß-estradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-estradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-etinil estradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosteron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-cumilfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terț*-octilfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenină (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazină (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Ftalat de butil benzil (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG

▼M8

	Substanță	NR CAS	Testul STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]		Sursa datelor pentru clasificare [4]		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} [b], [3] (M)	Alte ER TA [c]	Legare de ER	Uterotrofică
13	Corticosteron [a]	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Cumestrol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeină [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Dietilstilbestrol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG
18	Etilparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(no PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estronă [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genisteină [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kemferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Keponă [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron [a]	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Hexestrol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metiltestosteron [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT

▼M8

	Substanță	NR CAS	Testul STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]		Sursa datelor pentru clasificare [4]		
			Activitatea ER TA	Valoare PC_{10} (M)	Valoare PC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea EC_{50} [b], [3] (M)	Alte ER TA [c]	Legare de ER	Uterotrofică
28	Morin	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Noretinodrel [a]	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	*p,p*'-metoxiclor [a]	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(fără PC_{50}) [a]	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital [a]	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT
32	Reserpină	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolactonă [a]	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; EC_{50} = jumătate din concentrația maximă efectivă a substanței de testat; NEG = negativ; POS = pozitiv; NT = Netestat; PC_{10} (și PC_{50}) = concentrația unei substanțe de testat la care răspunsul este de 10 % (sau 50 % pentru PC_{50}) din răspunsul indus de martorul pozitiv (E2, 1nM) pe fiecare placă.

([a]) Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind agoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA [Raportul de evaluare ICCVAM VM7Luc ER TA, tabelul 4-1) (3)].

([b]) Concentrația maximă testată în absența unor limitări datorate citotoxicității sau insolubilității a fost de 1×10^{-5} M (testul STTA) și de 1×10^{-3} M (testul VM7Luc ER TA).

([c]) Numărul dintre paranteze reprezintă rezultatele testelor clasificate drept pozitive (POS) sau negative (NEG) din numărul total de studii de referință.

([1]) Valori raportate în Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

([3]) Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

([4]) Clasificarea ca substanțe agoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru metodele de testare pentru legare de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Note: Testele individuale din cadrul acestei metode de testare nu au aceleași măsurători. În unele situații, valoarea EC_{50} nu poate fi calculată, deoarece nu se generează o curbă de răspuns la administrarea unei doze complete. Chiar dacă, odată cu testul STTA, valoarea PC_{10} este o măsură-cheie, pot exista și alte exemple în care o valoare PCx va furniza informații utile.

▼M8

Tabelul 2

Compararea rezultatelor testelor STTA și VM7Luc ER TA pentru substanțele testate în cadrul ambelor teste privind antagoniștii și clasificate ca reprezentând antagoniști ER (POS) sau negative (NEG)

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]		Testul VM7Luc ER TA [2]		ER STTA efecte candidate [4]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b], [3] (M)				
1	4-hidroxi-tamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
2	Dibenzo[a.h]antracen	53-70-3	POS	Fără IC_{50}	POS	Fără IC_{50}	POS	PP	Compus policiclic	Substanță chimică de laborator, produs natural
3	Mifepristonă	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	ușor POS	NEG	Steroid	Produs farmaceutic
4	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
6	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar

▼M8

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]		Testul VM7Luc ER TA [2]		ER STTA efecte candidate [4]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b] (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} [b], [3] (M)				
7	Apigenină	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Compus heterociclic	Colorant, produs natural, produs farmaceutic intermediar
8	Atrazină	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Compus heterociclic	Erbicid
9	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, acid ftalic	Ingredient cosmetic, substanță chimică industrială, plastifiant
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	netestat	PN	Compus heterociclic, pirimidină	Fungicid
11	Flavonă	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
12	Flutamidă	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amidă	Produs farmaceutic, agent veterinar
13	Genisteină	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic

▼M8

	Substanță ([a])	NR CAS	Testul ER STTA ([1])		Testul VM7Luc ER TA ([2])		ER STTA efecte candidate ([4])	ICCVAM ([5]) Clasificare prin consens	MeSH ([6]) Clasă chimică	Clasă de produse ([7])
			Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} ([b]) (M)	Activitatea ER TA	Valoarea IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	netestat	NEG	Fenol	Substanță chimică intermediară
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Hidrocarbură (ciclică)	Produs natural

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = jumătate din concentrația maximă de inhibare a substanței de testat; NEG = negativ; PN = presupus negativă; POS = pozitiv; PP = presupus pozitivă.

([a]) Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind antagoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) Concentrația maximă testată în absența unor limitări datorate citotoxicității sau insolubilității a fost de 1×10^{-3} M (testul STTA) și de 1×10^{-5} M (testul VM7Luc ER TA).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

([4]) Activitatea STTA ER presupusă din efectele raportate ale acestora, care sunt cunoscute din datele istorice ale CERI privind testul de legare de receptorul ER, testul uterotrofic și informații colectate din literatura disponibilă (2)

([5]) Clasificarea ca substanțe antagoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele privind legarea de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Data Bank) a National Library of Medicine din Statele Unite (material).

▼M8

COMPONENTELE TESTULUI ER TA

Componentele esențiale ale testului

11. Prezenta metodă de testare se aplică pentru testele care utilizează un receptor ERα transfectat stabil sau endogen și o structură de gene reporter transfectate stabil sub controlul unuia sau mai multor elemente de răspuns estrogen; însă, pot fi prezenți și alți receptori precum ERβ. Acestea sunt componente esențiale ale tstului.

Martori

12. Ar trebui să se descrie baza pentru standardele de referință propuse în paralel pentru fiecare test agonist și antagonist. Martorii testați în paralel (negativi, tratați cu solvent și pozitivi), după caz, servesc drept indicatori pentru operativitatea testului în condițiile de testare și furnizează o bază pentru comparații între experimente; acestea fac parte, de obicei, din criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (1).

Proceduri standard de control al calității

13. Ar trebui să se desfășoare proceduri standard de control al calității, astfel cum este descris pentru fiecare test, pentru a se asigura faptul că linia celulară rămâne stabilă în urma mai multor treceri, că rămâne fără micoplasme (și anume, fără contaminare bacteriană) și că își menține capacitatea de a furniza în timp răspunsurile mediate de ER preconizate. Ar trebui să se verifice în continuare identitatea corectă a liniilor celulare, precum și a altor contaminanți (de exemplu, fungi, drojdie și virusuri).

Demonstrarea competenței laboratorului

14. Înainte de a testa substanțe chimice necunoscute prin oricare dintre testele realizate în cadrul acestei metode de testare, fiecare laborator ar trebui să își demonstreze capacitatea de a utiliza testul. Pentru a-și demonstra competența, fiecare laborator ar trebui să testeze cele 14 substanțe de verificare enumerate în tabelul 3 pentru testul agoniștilor și 10 substanțe de verificare din tabelul 4 pentru testul antagoniștilor. Această testare a competenței va confirma, de asemenea, capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Lista substanțelor de verificare constituie un subset al substanțelor de referință prevăzute în standardele de performanță pentru testele ER TA (6). Aceste substanțe sunt disponibile în comerț, reprezintă clasele de substanțe chimice asociate în mod obișnuit cu activitatea agonistă sau antagonistă ER, prezintă un interval adecvat de putere preconizată pentru agoniștii/antagoniștii ER (și anume, puternice sau slabe) și includ substanțe negative. Testarea substanțelor de verificare ar trebui să fie duplicate cel puțin de două ori, în zile diferite. Performanța este demonstrată prin clasificarea corectă (pozitiv/negativ) a fiecărei substanțe de verificare. Testarea competenței ar trebui să fie repetată de către fiecare tehnician atunci când învață testele. În funcție de tipul de celule, unele dintre aceste substanțe de verificare ar putea să se comporte ca SERM și să manifeste o activitate atât ca agoniști, cât și ca antagoniști. Însă, substanțele de verificare sunt clasificate în tabelele 3 și 4 după activitatea lor predominantă cunoscută care ar trebui utilizată pentru evaluarea competenței.

15. Pentru a demonstra performanța și pentru controlul calității, fiecare laborator ar trebui să compileze baze de date istorice despre agoniști și antagoniști cu standard de referință (de exemplu, 17β-estradiol și tamoxifen) și date despre substanțe chimice martor pozitive și negative și martori tratați cu solvent (de exemplu, DMSO). Pentru început, baza de date ar trebui să fie generată în urma a cel puțin 10 teste independente privind agoniștii (de exemplu, 17β-estradiol) și 10 teste independente privind antagoniștii (de exemplu, tamoxifen). Ar trebui să se adauge rezultatele analizelor viitoare privind aceste standarde de referință și martori tratați cu solvent pentru a extinde baza de date și pentru a asigura consecvența și performanța testului biologic de către laborator în timp.

▼M8

Tabelul 3

Lista (14) substanțelor de verificare pentru testul agoniștilor [1]

Nr. [8]	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat [2]	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH [6]	Clasă de produse [7]
				Valoarea PC_{10} (M) [3]	Valoarea PC_{50} (M) [3]	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) [4]	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) [5]		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14} - 10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hidrocarbură (ciclică)	Agent veterinar, farmaceutic
12	17α-estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
15	*meso*-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
11	4-*terț*-octilfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11} - 10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Substanță chimică intermediară
9	Genisteină	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11} - 10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11} - 10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Substanță chimică intermediară

▼M8

Nr. ([8])	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat ([2])	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH ([6])	Clasă de produse ([7])
				Valoarea PC_{10} (M) ([3])	Valoarea PC_{50} (M) ([3])	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) ([5])		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11} - 10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural
3	Ftalat de butil benzil	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Acid carboxilic, ester, acid ftalat	Plastifiant, substanță chimică industrială
4	*p*,*p*'- Metoxiclor	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11} - 10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hidrocarbură (halogenată)	Pesticid, agent veterinar
1	Etilparaben	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11} - 10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Acid carboxilic, fenol	Produs farmaceutic, conservant
17	Atrazină	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10} - 10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Compus heterociclic	Erbicid
20	Spironolactonă	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lactonă, steroid	Produs farmaceutic
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Compus heterociclic	Produs farmaceutic

▼M8

Nr. ([8])	Substanță	NR CAS	Răspuns preconizat ([2])	Testul STTA			Testul VM7Luc ER TA		Clasa de substanțe chimice MeSH ([6])	Clasă de produse ([7])
				Valoarea PC_{10} (M) ([3])	Valoarea PC_{50} (M) ([3])	Interval de concentr. de testare (M)	Valoarea VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) ([5])		
22	Reserpină	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11} - 10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Compus heterociclic, indol	Produs farmaceutic, agent veterinar

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; EC_{50} = jumătate din concentrația maximă efectivă a substanței de testat; NEG = negativ; POS = pozitiv; PC_{10} (și PC_{50}) = concentrația unei substanțe de testat la care răspunsul este de 10 % (sau 50 % pentru PC_{50}) din răspunsul indus de martorul pozitiv (E2, 1nM) pe fiecare placă.

([1]) Clasificarea ca substanță pozitivă sau negativă pentru activitatea de agonist ER s-a bazat pe documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele de legare de ER și TA (31), precum și pe datele empirice și pe alte informații obținute din studii de referință publicate și revizuite după finalizarea documentelor BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Valori raportate în Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).

([3]) Valorile medii EC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

([4]) Concentrațiile raportate au fost concentrațiile cele mai mari testate (identificarea intervalelor) în timpul validării testului VM7Luc ER TA. În cazul în care există diferențe de concentrații între laboratoare, se consemnează cea mai mare concentrație. A se vedea tabelul 4-10 din Raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM; Metoda de testare LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Database) a National Library of Medicine din Statele Unite (material)

([7]) Din tabelul 1 [Lista substanțelor chimice de referință (22) pentru evaluarea preciziei agoniștilor ER] din standardele de performanță (6)

([8]) Dacă o substanță de verificare nu mai este disponibilă în comerț, poate fi utilizată o substanță cu aceeași clasificare și cu o putere, mod de acțiune și clasă de substanțe chimice comparabile.

▼M8

Tabelul 4

Lista (10) substanțelor de verificare pentru testul antagoniștilor

	Substanță [a]	NR CAS	Testul ER STTA [1]			Testul VM7Luc ER TA [2]			Efectele candidate ER STTA [1]	ICCVAM [5] Clasificare prin consens	MeSH [6] Clasă chimică	Clasă de produse [7]
			Activitatea ER TA	IC_{50} (M)	Interval de concentr. de testare (M)	Activitatea ER TA	IC_{50} [3] (M)	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) [4]				
1	4-hidroxi-tamoxifen	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
2	Raloxifen HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	valoare POS moderată	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hidrocarbură (ciclică)	Produs farmaceutic
4	17β-estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	spre negativ (*)	PN	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
5	Apigenină	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Compus heterociclic	Colorant, produs natural, produs farmaceutic intermediar
6	Ftalat de di-n-butil	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, acid ftalic	Ingredient cosmetic, substanță chimică industrială, plastifiant

▼M8

	Substanță ([a])	NR CAS	Testul ER STTA ([1])			Testul VM7Luc ER TA ([2])			Efectele candidate ER STTA ([1])	ICCVAM ([5]) Clasificare prin consens	MeSH ([6]) Clasă chimică	Clasă de produse ([7])
			Activitatea ER TA	IC_{50} (M)	Interval de concentr. de testare (M)	Activitatea ER TA	IC_{50} ([3]) (M)	Cea mai mare concentr. pentru identificatorul de intervale (M) ([4])				
7	Flavonă	525-82-6	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	PN	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
8	Genisteină	446-72-0	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	NEG	Flavonoid, compus heterociclic	Produs natural, farmaceutic
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	10^{-9} – 10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	netestat	NEG	Fenol	Substanță chimică intermediară
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	10^{-8} – 10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	spre negativ (*)	NEG	Hidrocarbură (ciclică)	Produs natural

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = jumătate din concentrația maximă de inhibare a substanței de testat; NEG = negativ; PN = presupus negativă; POS = pozitiv.

(*) clasificată ca fiind negativă analizei literaturii de specialitate (2).

([a]) Substanțe comune testate în cadrul testelor STTA și VM7Luc ER TA care au fost desemnate ca fiind antagoniști ER sau negative și utilizate pentru a evalua precizia în studiul de validare VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2)

([2]) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) Valorile medii IC_{50} au fost calculate cu valori raportate de laboratoarele în care a fost realizat studiul de validare VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM și Hiyoshi) (3).

([4]) Concentrațiile raportate au fost concentrațiile cele mai mari testate (identificarea intervalelor) în timpul validării testului VM7Luc ER TA. În cazul în care există diferențe de concentrații între laboratoare, se consemnează cea mai mare concentrație. A se vedea tabelul 4-11 din Raportul de evaluare a metodei de testare ICCVAM; Metoda de testare LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): Un test *in vitro* pentru identificarea activității substanțelor chimice ca agoniști sau antagoniști ai receptorilor de estrogen (An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Clasificarea ca substanțe antagoniste ER sau negative a fost bazată pe informații din documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru metodele de testare privind legarea de ER și TA (31), precum și pe informații obținute din lucrările publicate și revizuite după finalizarea BRD ale ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Data Bank) a National Library of Medicine din Statele Unite (material).

▼M8

Criteriile de acceptabilitate a unui test

16. Acceptarea sau respingerea unui test se bazează pe evaluarea rezultatelor obținute pentru standardele și martorii de referință utilizați pentru fiecare experiment. Valorile pentru PC_{50} (EC_{50}) sau IC_{50} pentru standardele de referință ar trebui să îndeplinească criteriile de acceptabilitate prevăzute pentru testul selectat (pentru STTA, a se vedea apendicele 2, pentru VM7Luc ER TA, a se vedea apendicele 3) și toți martorii pozitivi/negativi ar trebui să fie clasificați în mod corect pentru fiecare experiment acceptat. Capacitatea de a efectua în mod consecvent testul ar trebui să fie demonstrată prin dezvoltarea și întreținerea unei baze de date istorice pentru standardele de referință și martori (a se vedea punctul 15). Ca o măsură a reproductibilității în cadrul laboratorului, pot fi utilizate abateri standard (SD) sau coeficienți de variație (CV) pentru mediile de pe curba standardelor de referință care corelează parametrii din cadrul mai multor experimente. În plus, ar trebui să fie îndeplinite următoarele principii referitoare la criteriile de acceptabilitate:

— Datele ar trebui să fie suficiente pentru o evaluare cantitativă a activării ER (pentru testul de agonist) sau a suprimării ER (pentru testul de antagonist) (și anume, eficacitate și putere).

— Activitatea medie a reporterilor pentru concentrația de referință a estrogenului de referință ar trebui să fie cel puțin egală cu valoarea minimă specificată în teste, raportat la valoarea martorului tratat cu vehicul (solvent) pentru a asigura o sensibilitate adecvată. Pentru testele STTA și VM7Luc ER TA, aceasta este de patru ori mai mare decât media martorului tratat cu vehicul de pe fiecare placă.

— Concentrațiile testate ar trebui să rămână în intervalul de solubilitate al substanțelor chimice de testat și să nu demonstreze citotoxicitate.

Analiza datelor

17. Ar trebui să se recurgă la procedura specifică de interpretare a datelor pentru fiecare test pentru clasificarea unui răspuns pozitiv și negativ.

18. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate (punctul 16) indică faptul că testul funcționează în mod corespunzător, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Reproducerea rezultatelor primei testări indică cel mai bine faptul că au fost generate date precise. Dacă sunt generate rezultate reproductibile în urma a două testări (de exemplu, rezultatele ambelor testări indică faptul că o substanță chimică de testat este pozitivă), nu este necesar să se efectueze o a treia testare.

19. Dacă două testări nu generează rezultate reproductibile (de exemplu, o substanță chimică de testat este pozitivă într-un test și negativă în celălalt test) sau în cazul în care este necesar un grad mai mare de certitudine în ceea ce privește rezultatul acestui test, ar trebui să fie efectuate cel puțin trei testări independente. În acest caz, clasificarea se bazează pe cele două rezultate concordante din trei.

Criterii generale de interpretare a datelor

20. În prezent, nu există nicio metodă convenită în mod universal pentru interpretarea datelor ER TA. Însă ambele evaluări calitative (de exemplu, pozitiv/negativ) și/sau cantitative (de exemplu, EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) ale activității mediate de ER ar trebui să fie bazate pe date empirice și un raționament științific solid. Dacă este posibil, rezultatele pozitive ar trebui să fie caracterizate atât de magnitudinea efectului față de martorul tratat cu vehicul (solvent) sau de estrogenul de referință, cât și de concentrația la care se produce efectul (de exemplu, EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} etc.).

▼**M8**

Raport testului

21. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Test:

— test utilizat;

— martor/standard de referință/substanță chimică de testat;

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent/vehicul:

— caracterizare (natură, furnizor și lot);

— justificarea alegerii solventului/vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște.

Celule:

— tipul și sursa celulelor:

  • Este ER exprimat din punct de vedere endogen? Dacă nu, ce receptor(i) a/au fost transfectat (transfectați)?

  • structura (structurile) de reporter utilizată (utilizate) (inclusiv specii sursă);

  • metoda de transfectare;

  • metoda de selecție pentru menținerea stabilității transfectării (dacă este cazul);

  • Metoda de transfectare este relevantă pentru liniile stabile?

— numărul trecerilor de celule (de la decongelare);

▼**M8**

— numărul trecerilor de celule la decongelare;

— metode de întreținere a culturilor de celule.

Condiții de testare:

— limite de solubilitate;

— descrierea metodelor de evaluare a viabilității aplicate;

— compoziția mediilor, concentrația CO_2;

— concentrațiile substanței chimice de testat;

— volumul vehiculului și al substanței chimice de testat adăugate;

— temperatura și umiditatea de incubație;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară la începutul și în timpul tratamentului;

— standarde de referință pozitive și negative;

— reactivii reporter (denumirea produsului, furnizor și lot);

— criterii utilizate la aprecierea testelor ca fiind pozitive, negative sau echivoce.

Verificarea de acceptabilitate:

— inducții multiple pentru fiecare placă de testare și dacă acestea respectă cerințele minime ale testului pe baza martorilor testați anterior;

— valorile efective pentru criteriile de acceptabilitate, de exemplu, $log_{10}EC_{50}$, $log_{10}PC_{50}$, $logIC_{50}$ și valorile Hillslope, pentru martorii pozitivi testați în paralel/standardele de referință.

Rezultate:

— date brute și normalizate;

— nivelul maxim de multiplicare a inducției;

— date privind citotoxicitatea;

— dacă există, cea mai redusă valoare a concentrației efective (LEC);

— valorile RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} și/sau EC_{50}, după caz;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

▼M8

— analize statistice, dacă există, împreună cu o măsurare a erorii și a încrederii (de exemplu, SEM, SD, CV sau 95 % CI) și o descriere a modului în care au fost obținute aceste valori.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 225), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. și Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 173), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 174), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. și Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals, 28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. şi Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. şi Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Apendicele D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (nr. 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. şi Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII ȘI ABREVIERI

Criterii de acceptabilitate: Standarde minime pentru efectuarea de controale experimentale și standarde de referință. Toate criteriile de acceptabilitate ar trebui să fie îndeplinite pentru ca un experiment să fie considerat valabil.

Precizie (concordanță): Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (1).

Agonist: O substanță care produce un răspuns, de exemplu, transcriere, atunci când se leagă de un anumit receptor.

Antagonist: Un tip de receptor ligand sau substanță chimică ce nu provoacă un răspuns biologic ea însăși la legarea de un receptor, însă blochează sau atenuează răspunsurile mediate de agonist.

Activitate antiestrogenică: capacitatea unei substanțe chimice de a suprima acțiunea substanței 17β-estradiol mediate prin receptori estrogeni.

Morfologia celulei: forma și aspectul celulelor cultivate într-un monostrat într-un singur godeu de pe placa de cultură a țesutului. Celulele care mor prezintă adesea o morfologie celulară anormală.

CF: Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea disruptorilor endocrini.

Tratare cu cărbune/dextran: Tratarea serului utilizat în cultura celulară. Tratarea cu cărbune/dextran (denumită adesea „stripare”) elimină hormonii endogeni și proteinele care leagă hormonii.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Citotoxicitate: Efecte dăunătoare asupra structurii sau funcției celulelor care pot provoca, în cele din urmă, moartea celulelor și se pot reflecta printr-o reducere a numărului de celule prezente în godeu la sfârșitul perioadei de expunere sau o reducere a capacității de măsurare a funcției celulare comparativ cu martorul tratat cu vehicul testat în paralel.

CV: Coeficient de variație

DCC-FBS: Ser fetal bovin tratat cu cărbune acoperit cu dextran.

DMEM: Modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle

DMSO: Dimetil sulfoxid

E2: 17β-estradiol

EC50: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat.

ED: Perturbare endocrină

hERα: Receptor alfa de estrogen uman

▼**M8**

hERß: Receptor beta de estrogen uman

EFM: Mediu fără estrogen. Modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle (DMEM) suplimentată cu soluție 4,5 % FBS tratată cu cărbune/dextran, 1,9 % L-glutamină și 0,9 % Pen-Strep.

ER: Receptor de estrogen

ERE: Element de răspuns estrogen

Activitate estrogenă: Capacitatea unei substanțe chimice de a imita 17β-estradiol în capacitatea sa de a se lega de receptorii de estrogen și de a-i activa. Cu această metodă de testare se poate detecta activitatea estrogenă mediată de hERα.

ERTA: Transactivare a receptorului de estrogen

FBS: Ser fetal bovin

HeLa: O linie celulară cervicală umană nemuritoare

HeLa9903: O subclonă de celule HeLa în care au fost transfectate în mod stabil hERαα și o genă luciferază reporter

$\mathbf{IC_{50}}$: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat inhibitoare.

ICCVAM: Comitetul de coordonare între agenții cu privire la validarea metodelor alternative (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproductibilitatea între laboratoare: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproductibilitatea între laboratoare este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (1).

Reproductibilitatea în cadrul laboratorului: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (1).

LEC: Concentrația efectivă cea mai scăzută este concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testat care produce un răspuns (și anume, cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat la care inducția multiplă este statistic diferită de martorul tratat cu vehicul testat în paralel).

Testul „me-too”: O expresie colocvială utilizată pentru un test care este, din punct de vedere structural și funcțional, similar cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară.

MT: Metalotioneină

MMTV: Virusul tumorilor mamare la șoareci

OHT: 4-hidroxi-tamoxifen

PBTG: Orientarea privind testarea pe baza performanței

▼**M8**

MP (Martor pozitiv): o substanță puternic activă, de preferință 17ß-estradiol, care este inclusă în toate testele pentru a contribui la buna funcționare a testului.

PC_{10}: concentrația unei substanțe chimice de testat la care activitatea măsurată într-un test de agonist este de 10 % din activitatea maximă indusă de MP (E2 la 1nM pentru testul STTA) pe fiecare placă.

PC_{50}: concentrația unei substanțe chimice de testat la care activitatea măsurată într-un test de agonist este de 50 % din activitatea maximă indusă de MP (E2 la concentrația de referință specificată în metoda de testare) pe fiecare placă.

PC_{Max}: concentrația unei substanțe chimice de testat care induce valoarea RPCMax

Standarde de performanță: Standarde bazate pe un test validat, care asigură baza pentru evaluarea comparabilității unui test propus similar din punct de vedere al mecanismului și funcțional. Sunt incluse (1) componente esențiale ale testului; (2) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanța acceptabilă a metodei de testare validate; și (3) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin testul propus la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (1).

Substanțe de verificare: Un subset de substanțe de referință incluse în standardele de performanță, care pot fi utilizate de către laboratoare pentru a demonstra competența tehnică cu o metodă de testare standardizată. Criteriile de selecție pentru aceste substanțe includ, de regulă, faptul că acestea reprezintă intervalul de răspunsuri, sunt disponibile în comerț și pentru acestea există date de referință de înaltă calitate.

Competență: Capacitatea demonstrată de a efectua în mod corespunzător un test înainte de a testa substanțe necunoscute.

Estrogen de referință (martor pozitiv, MP): 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Standard de referință: O substanță de referință utilizată pentru a demonstra caracterul adecvat al unui test. 17β-estradiol este standardul de referință pentru testele STTA și VM7Luc ER TA.

Metode de testare de referință: Testele pe care se bazează PBTG 455.

Relevanță: Descrierea relației dintre un test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (1).

Fiabilitate: Un indicator al faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare.

RLU: Unități de lumină relative

ARN: Acid ribonucleic

RPC_{Max}: nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat, exprimat ca procent din răspunsul indus de 1 nM E2 pe aceeași placă

▼M8

RPMI: Un mediu RPMI 1 640 completat cu soluție de 0,9 % Pen-Strep și 8,0 % ser fetal bovin (FBS)

Test: Un experiment individual care evaluează acțiunea chimică asupra rezultatului biologic al testului. Fiecare test constituie un experiment complet realizat în godeuri duplicate de celule așezate în placă dintr-o rezervă comună de celule în același timp.

Test independent: Un experiment separat, independent, care evaluează acțiunea chimică asupra rezultatului biologic al testului, utilizând celule dintr-o rezervă diferită, substanțe chimice diluate recent, și care este realizat în zile diferite sau în aceeași zi de către persoane diferite.

SD: Abatere standard.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor pozitive/active clasificate corect în urma testului. Aceasta măsoară precizia în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (1).

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor negative/inactive clasificate corect în urma testului. Aceasta măsoară precizia în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (1).

Transfectare stabilă: Atunci când ADN-ul este transfectat în celule cultivate, astfel încât este integrat în mod stabil în genomul celulelor, ceea ce conduce la manifestarea stabilă a genelor transfectate. Clonele celulelor transfectate stabil sunt selectate prin markeri stabili (de exemplu, rezistența la G418).

Testul STTA: Test de transactivare cu transfectare stabilă, test de activare transcripțională ERα utilizând linia celulară HeLa 9 903.

Studiu: Întreaga serie de lucrări experimentale realizate pentru evaluarea unei singure substanțe specifice, utilizând un anumit test. Un studiu cuprinde toate etapele, inclusiv testele de diluare a substanței de testat în mediile de testare, testele preliminare de identificare a intervalelor, toate testele complexe necesare, analize ale datelor, asigurarea calității, evaluările ale citotoxicității etc. Finalizarea unui studiu permite clasificarea activității substanței chimice de testat asupra obiectivului de toxicitate (și anume, activă, inactivă sau neconcludentă) care este evaluat prin testul utilizat și o estimare a puterii cu raportare la substanța chimică de referință pozitivă.

Substanță: În cadrul REACH ([1]), o substanță este definită ca fiind un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru păstrarea stabilității acesteia și orice impurități care derivă din procesul utilizat, cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția. O definiție foarte similară este utilizată în contextul GHS al ONU (1).

TA (Transactivare): Inițierea sintezei mRNA ca răspuns la semnalul unei anumite substanțe chimice, cum ar fi legarea unui estrogen de receptorul de estrogen

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei (JO L 304, 22.11.2007, p. 1).

▼**M8**

Test: În contextul prezentei metode de testare, un test constituie una dintre metodologiile acceptate ca fiind valabile pentru îndeplinirea criteriilor de performanță prezentate. Componentele testului includ, de exemplu, linia celulară specifică, cu condiții de creștere asociate, medii specifice în care se desfășoară testul, condiții de pregătire a plăcii, dispunerea și diluțiile substanțelor chimice de testat, împreună cu orice alte măsuri de control al calității impuse și etapele conexe de evaluare a datelor.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Transcriere: sinteza mARN

UVCB: substanțe chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă și materiale biologice

Metodă de testare validată: Un test pentru care au fost realizate studii de validare pentru determinarea relevanței (inclusiv a preciziei) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (1).

Validare: Procesul prin care se stabilește fiabilitatea și relevanța unei anumite abordări, metode, test, proces sau evaluări specifice pentru un scop definit (1).

VC (Martor tratat cu vehicul): Solventul utilizat pentru dizolvarea substanțelor chimice de testat și a celor martor este testat numai ca vehicul, fără substanța chimică dizolvată.

VM7: O celulă de adenocarcinom imortalizat care exprimă în mod endogen receptorul de estrogen.

VM7Luc4E2: Linia celulară VM7Luc4E2 a fost derivată din celule de adenocarcinom VM7 imortalizate de la om care exprimă în mod endogen ambele forme ale receptorului de estrogen (ERα și ERβ) și au fost transfectate stabil cu plasmidă pGudLuc7.ERE. Această plasmidă conține patru copii ale unei oligonucleotide sintetice care conține elementul de răspuns estrogen în amonte de promotorul virusului tumoral mamar (MMTV) la șoareci și de gena luciferazei la licurici.

Martor slab pozitiv: O substanță slab activă selectată din lista substanțelor chimice de referință, care este inclusă în toate testele pentru a contribui la buna funcționare a testului.

▼**M8**

Apendicele 2

TESTUL DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI A DE ESTROGEN UMAN TRANSFECTAT STABIL PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII AGONISTE ȘI ANTAGONISTE A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE UTILIZEAZĂ LINIA CELULARĂ HERA-HELA-9903

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Acest test de transactivare (TA) utilizează linia celulară hERα-HeLa-9 903 pentru a detecta activitatea agonistă estrogenă mediată prin receptorul alfa de estrogen uman (hERα). Studiul de validare a testului de transactivare cu transafectare stabilă (STTA) realizat de către Institutul Japonez de Cercetare și Evaluare a Substanțelor Chimice (CERI) folosind linia celulară hERα-HeLa-9 903 pentru a detecta activitatea agonistă și antagonistă estrogenă mediată prin receptorul de estrogen uman (hERα) a demonstrat relevanța și fiabilitatea testului pentru scopul prevăzut (1).

2. Acest test este conceput special pentru a detecta TA mediată de hERα prin măsurarea chemiluminiscenței ca punct final. Însă au fost raportate semnalele de luminescență nemediate de receptori la concentrații de fitoestrogen mai mari de 1 μM din cauza supraactivării genei luciferază reporter (2) (3). În timp ce curba doză-răspuns indică faptul că o reală activare a sistemului ER se produce la concentrații mai mici, expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau compuși similari susceptibili de a produce o supra-activare a genei luciferază reporter similară fitoestrogenilor trebuie să fie atent examinată în cadrul sistemelor de testare ER TA transfectat stabil (apendicele 1).

3. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” și „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 2.1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

4. Testul este utilizat pentru a indica legarea receptorului de estrogen cu un ligand. După legarea cu ligand, complexul receptor-ligand circulă spre nucleu unde leagă anumite elemente de răspuns ADN și transactivează o genă luciferază reporter de licurici, ceea ce determină o expresie celulară crescută a enzimei luciferază. Luciferina este un substrat care este transformat de enzima luciferază într-un produs de bioluminiscență care poate fi măsurat cantitativ cu un luminometru. Activitatea luciferazei poate fi evaluată rapid și cu costuri reduse cu ajutorul unor truse de testare disponibile în comerț.

5. Sistemul de testare utilizează linia celulară hERα-HeLa-9 903, care provine de la o tumoră cervicală umană, cu două structuri inserate în mod stabil: (i) structura expresiei hERαα (codificând receptorul uman complet) și (ii) o structură reporter de luciferază de la licurici care poartă cinci repetiții în tandem de un element de vitelogenină reactiv la estrogen (ERE) activat de un element TATA promotor de metalotioneină (MT) de la șoarece. S-a demonstrat că structura genei TATA MT de la șoarece are cele mai bune performanțe și, prin urmare, este folosită în mod frecvent. În consecință, această linie celulară hERα-HeLa-9 903 poate măsura capacitatea unei substanțe chimice de testat de a induce transactivarea mediată de hERα a expresiei genei luciferază.

▼M8

6. În cazul testului de agonist ER, interpretarea datelor se bazează pe problema dacă nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat este mai mare decât sau egală cu răspunsul unui agonist echivalent cu 10 % din răspunsul indus de o concentrație cu inducere maximă (1 nM) a martorului pozitiv (MP) 17β-estradiol (E2) (și anume, PC10). În cazul testului de antagonist al ER, interpretarea datelor se bazează pe problema dacă răspunsul indică cel puțin o reducere de 30 % a activității pe baza răspunsului indus de creșterea bruscă a concentrației martorului (25 pM din E2) fără citotoxicitate. Analiza datelor și interpretarea sunt discutate în detaliu la punctele 34-48.

PROCEDURA

Linii celulare

7. Pentru test ar trebui să se utilizeze linia celulară hERα-HeLa-9 903 transfectată stabil. Linia celulară poate fi obținută din colecția japoneză Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1]), la semnarea unui acord de transfer de material (MTA).

8. Pentru testare ar trebui să se utilizeze numai celule caracterizate ca fiind fără micoplasme. RT-PCR (reacție de polimerizare în lanț în timp real) reprezintă metoda aleasă pentru detectarea sensibilă a infecției cu micoplasme (4) (5) (6).

Stabilitatea liniei celulare

9. Pentru a monitoriza stabilitatea liniei celulare, E2, ar trebui să se utilizeze 17α-estradiol, 17α-metiltestosteron și corticosteron ca standarde de referință pentru testul agonist și ar trebui să se măsoare o curbă concentrație-răspuns completă în intervalul de concentrații de testare prevăzut în tabelul 1 cel puțin o dată la fiecare testare, iar rezultatele ar trebui să fie consecvente cu rezultatele prezentate în tabelul 1.

10. În cazul testului antagonist, ar trebui să se măsoare simultan, la fiecare testare, curbele complete ale concentrației pentru două standarde de referință, tamoxifen și flutamidă. Ar trebui să se monitorizeze clasificarea calitativă corectă ca fiind pozitivă sau negativă pentru cele două substanțe chimice.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

11. Celulele ar trebui să fie păstrate în mediul esențial minim al lui Eagle (EMEM) fără roșu de fenol, suplimentat cu 60 mg/l de antibiotic kanamicină și 10 % ser fetal bovin tratat cu cărbune și acoperit cu dextran (DCC-FBS), într-un incubator CO2 (5 % CO2) la 37 ± 1°C. La atingerea unei confluențe de 75-90 %, celulele pot fi subcultivate la 10 din 0,4 x 105 – 1 x 105 celule/ml pentru un vas de cultură a celulelor de 100 mm. Celulele ar trebui să fie suspendate în soluție de 10 % FBS-EMEM (care este identic cu EMEM cu DCC-FBS) și apoi aranjate în godeurile unei microplăci la o densitate de 1 x 104 celule/(100 µl x godeu). Apoi, celulele ar trebui să fie preincubate într-un incubator cu 5 % CO2 la 37° ± 1 °C timp de 3 ore înainte de expunerea la substanțe chimice. Materialul din plastic ar trebui să fie fără activitate estrogenă.

12. Pentru a menține integritatea răspunsului, celulele ar trebui să fie cultivate pentru mai multe pasaje din stocul congelat în mediu condiționat, dar nu pentru mai mult de 40 de pasaje. Pentru linia celulară hERα-HeLa-9 903, această perioadă va fi mai mică de trei luni. Însă performanța celulelor poate fi redusă dacă acestea sunt cultivate în condiții de cultură necorespunzătoare.

([1]) Banca de celule JCRB: Institutul Național de Inovație Biomedicală (National Institute of Biomedical Innovation), 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japonia Fax: +81-72-641-9812

▼M8

13. Soluția DCC-FBS poate fi preparată conform descrierii din apendicele 2.2 sau poate fi obținută din surse comerciale.

Criterii de acceptabilitate

Standarde de referință pozitive și negative pentru testul de agonist ER

14. Înaintea și în timpul studiului, capacitatea de răspuns a sistemului de testare ar trebui să fie verificată utilizând concentrațiile adecvate ale unui estrogen puternic: E2, un estrogen slab (17α-estradiol), un agonist foarte slab (17α-metiltestosteron) și o substanță negativă (corticosteron). Valorile din intervalul acceptabil derivate din studiul de validare (1) sunt date în tabelul 1. Aceste patru standarde de referință concurente ar trebui să fie incluse în fiecare experiment, iar rezultatele ar trebui să se încadreze în limitele acceptabile date. În caz contrar, ar trebui să se identifice cauza neîndeplinirii criteriilor de acceptabilitate (de exemplu, manipularea celulelor, precum și serul și antibioticele pentru calitate și concentrație), iar testul se repetă. Odată ce au fost îndeplinite criteriile de acceptabilitate, pentru a se asigura variabilitatea minimă a valorilor EC_{50}, PC_{50} and PC_{10}, este esențială utilizarea consecventă a materialelor pentru cultura celulară. Cele patru standarde de referință concurente, care ar trebui să fie incluse în fiecare experiment (realizat în aceleași condiții, inclusiv cu aceleași materiale, nivel de trecere a celulelor și tehnicieni) pot asigura sensibilitatea testului, deoarece valorile PC_{10} dintre cele trei standarde de referință pozitive ar trebui să se încadreze în intervalul acceptabil, la fel ca și valorile PC_{50}și EC_{50}, în cazul în care acestea pot fi calculate (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 1

Valori din intervalul acceptabil ale celor patru standarde de referință pentru testul de agonist ER

Denumire	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Panta Hill	Interval de testare
17β-estradiol (E2) CAS nr.: 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10^{-14} ~ 10^{-8}M
17α-estradiol CAS nr.: 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	10^{-12} ~ 10^{-6}M
Corticosteron CAS nr.: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10} ~ 10^{-4}M
17α-metiltestosteron CAS nr.: 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	10^{-11} ~ 10^{-5}M

Standarde de referință pozitive și negative pentru testul de antagonist ER

15. Înaintea și în timpul studiului, capacitatea de răspuns a sistemului de testare ar trebui să fie verificată utilizând concentrațiile adecvate ale unui substanțe pozitive (tamoxifen) și ale unei substanțe negative (flutamidă). Valorile din intervalul acceptabil derivate din studiul de validare (1) sunt date în tabelul 2. Aceste două standarde de referință concurente ar trebui să fie incluse în fiecare experiment, iar rezultatele ar trebui să fie evaluate ca fiind corecte conform criteriilor. În caz contrar, ar trebui să se identifice cauza neîndeplinirii criteriilor (de exemplu, manipularea celulelor, precum și serul și antibioticele pentru calitate și concentrație), iar testul se repetă. În plus, ar trebui să fie calculate valorile IC_{50} pentru o substanță pozitivă (tamoxifen), iar rezultatele ar trebui să se încadreze în limitele acceptabile date. Odată ce au fost îndeplinite criteriile de acceptabilitate, pentru a se asigura variabilitatea minimă a valorilor IC50, este esențială utilizarea consecventă a materialelor pentru cultura celulară. Cele două standarde de referință concurente care trebuie incluse în fiecare experiment (realizat în aceleași condiții, inclusiv cu aceleași materiale, nivel de trecere a celulelor și tehnicieni) pot asigura sensibilitatea testului (a se vedea tabelul 2).

▼M8

Tabelul 2

Criterii și valori din intervalul acceptabil ale celor două standarde de referință pentru testul de antagonist ER

Denumire	Criterii	$LogIC_{50}$	Interval de testare
Tamoxifen CAS nr.: 10 540-29-1	Pozitiv: Ar trebui să se calculeze IC50	-5,942-7,596	10-10 10-5 M
Flutamidă CAS nr.: 13 311-84-7	Negativ: Nu ar trebui să se calculeze IC30	—	10-10 10-5 M

Martori pozitivi și martori tratați cu vehicule

16. Martorul pozitiv (MP) pentru testul de agonist ER (1 nM din E2) și pentru testul de antagonist ER (10 μM TAM) ar trebui să fie testat de cel puțin trei ori pe fiecare placă. Vehiculul care se utilizează pentru a dizolva o substanță chimică de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu vehicul (VC) de cel puțin trei ori pe fiecare placă. în plus față de acest VC, dacă MP utilizează un vehicul diferit de cel al substanței chimice de testat, un alt VC ar trebui testat de cel puțin trei ori pe aceeași placă cu MP.

Criterii de calitate pentru testul de agonist ER

17. Activitatea medie a luciferazei la martorul pozitiv (1 nM E2) ar trebui să fie de cel puțin patru ori mai mare decât media VC pe fiecare placă. Acest criteriu se stabilește pe baza fiabilității valorilor punctelor finale din studiul de validare (istoric de patru până la 30 de ori).

18. În ceea ce privește controlul calității testului, inducția multiplicată corespunzătoare valorii PC10 a martorului MP testat în paralel (1 nM E2) ar trebui să fie mai mare de 1 + 2 SD din valoarea inducției multiplicate (= 1) a martorului VC testat în paralel. Pentru stabilirea priorităților, valoarea PC10 poate fi utilă pentru a simplifica analiza datelor, care este necesară în comparație cu o analiză statistică. Deși o analiză statistică oferă informații privind semnificația, o astfel de analiză nu constituie un parametru cantitativ în ceea ce privește potențialul bazat pe concentrație, și astfel este mai puțin utilă în scopul stabilirii priorităților.

Criterii de calitate pentru testul de antagonist ER

19. Activitatea medie a luciferazei la creșterea bruscă a concentrației martorului (25 pM E2) ar trebui să fie de cel puțin patru ori mai mare decât media VC pe fiecare placă. Acest criteriu se stabilește pe baza fiabilității valorilor punctelor finale din studiul de validare.

20. În ceea ce privește controlul calității testului, activarea transcripțională relativă (RTA) de 1 nM E2 ar trebui să fie mai mare de 100 %, RTA de 1μM 4-hidroxitamoxifen (OHT) ar trebui să fie mai mică de 40,6 % , iar RTA de 100 μM digitonină (Dig) ar trebui să fie mai mică de 0 %.

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea „COMPONENTELE TESTULUI ER TA” din prezenta metodă de testare).

Vehicul

21. Ca și VC testat în paralel ar trebui să se utilizeze dimetilsulfoxid (DMSO) sau un solvent adecvat, la aceeași concentrație utilizată pentru diferiții martori pozitivi și negativi, iar substanțele chimice de testat ar trebui să fie utilizate ca VC testat în paralel. Substanțele chimice de testat ar trebui să se dizolve într-un solvent care solubilizează substanța chimică de testat și este miscibil cu mediul celular. Vehicule adecvate sunt apa, etanolul (puritate de 95-100 %) și DMSO. În cazul în care se utilizează DMSO, nivelul nu ar trebui să depășească 0,1 % (v/v). Pentru orice vehicul, ar trebui să se demonstreze că volumul maxim utilizat nu este citotoxic și nu interferează cu performanțele testului.

▼M8

Prepararea substanțelor chimice de testat

22. În general, substanțele chimice de testat ar trebui să fie dizolvate în DMSO sau într-un alt solvent adecvat și diluate în serie cu același solvent la un raport comun de 1:10 în vederea preparării soluțiilor pentru diluare cu medii.

Solubilitate și citotoxicitate: Considerații pentru identificarea intervalului.

23. Ar trebui efectuat un test preliminar pentru a determina intervalul adecvat de concentrații pentru substanța chimică ce urmează să fie testată și pentru a confirma dacă substanța chimică de testat ar putea avea probleme de solubilitate și citotoxicitate. Inițial, substanțele chimice sunt testate până la concentrația maximă de 1 µl/ml, 1 mg/ml sau 1 mM, luându-se în considerare cea mai mică valoare. În funcție de gradul de citotoxicitate sau de lipsa solubilității observată la testul preliminar, prima testare specifică ar trebui să testeze substanța chimică la diluții log în serie, începând de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, 1 mM, 100 µM, 10 µM etc.) și se consemnează prezența aspectului cețos sau a precipitatului sau citotoxicitatea. Concentrațiile în cadrul celei de a doua și, dacă este necesar, celei de a treia testări ar trebui să fie ajustate, după caz, pentru a caracteriza mai bine curba concentrație-răspuns și pentru a evita concentrațiile care se dovedesc a fi insolubile sau a induce o citotoxicitate excesivă.

24. Agoniștii și antagoniștii de ER și prezența unor niveluri tot mai mari ale citotoxicității pot să modifice în mod semnificativ sau să elimine răspunsul sigmoidal tipic și ar trebui să fie luate în considerare la interpretarea datelor. Ar trebui să se folosească metode de testare a citotoxicității care pot oferi informații cu privire la viabilitatea celulară de 80 %, utilizând un test adecvat bazat pe experiența de laborator.

25. În cazul în care rezultatele testului de citotoxicitate arată că concentrația substanței chimice de testat a redus numărul celulelor cu 20 % sau mai mult, această concentrație ar trebui să fie considerată ca fiind citotoxică, iar concentrațiile la nivelul concentrației citotoxice sau peste aceasta ar trebui să fie excluse de la evaluare.

Expunerea la substanțe chimice și organizarea plăcilor pentru testare

26. Procedura pentru diluții chimice (etapele 1 și 2) și expunerea la celule (etapa 3) pot fi realizate după cum urmează:

Etapa 1: Fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie diluată în serie în DMSO sau înr-un solvent adecvat și adăugată în godeurile unei plăci de microtitrare pentru a realiza concentrații în serie finale, astfel cum sunt determinate prin testul preliminar de identificare a intervalului [de regulă, într-o serie, de exemplu, de 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, and 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)] pentru teste triple.

Etapa 2: Diluție chimică: Mai întâi se diluează 1,5 µl din substanța chimică de testat în solvent la un volum de 500 µl de medii.

Etapa 3: Expunerea celulelor la substanțe chimice: Se adaugă 50 µl de diluție cu medii (preparată în etapa 2) într-un godeu de analiză care conține 10^4 celule/100 µl/godeu.

Volumul final recomandat de medii necesar pentru fiecare godeu este de 150 µl. Eșantioanele de testare și standardele de referință pot fi distribuite astfel cum este indicat în tabelele 3 și 4.

▼**M8**

Tabelul 3

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a standardelor de referință pe placa de testare în cadrul testului de agonist ER

Rând	17α-metiltestosteron			Corticosteron			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO); MP: Martor pozitiv (1 nM E2)

27. Standardele de referință (E2, 17α-estradiol, 17-μετιλμτεστοστερονττιιχορτ-ιχοστερονχχαρατρεβυιτσ©©φιεφτεστατεττννχαδρυλχφιεχ©ρειρτεστ©ριρ-ρταβελυλαααααGodeurile cu MP tratați cu 1 nM de E2 și care pot produce o inducție maximă a E2 și VC tratați doar cu DMSO (sau un solvent adecvat) ar trebui să fie incluse pe fiecare placă de testare din cadrul analizei (tabelul 4). Dacă se utilizează celule din surse diferite (de exemplu, un număr de trecere diferit, un lot diferit etc.) în cadrul aceluiași experiment, ar trebui să se testeze standardele de referință pentru fiecare sursă celulară.

Tabelul 4

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a substanțelor chimice martor pe placa de testare în cadrul analizei de agonist ER

Rând	**Substanța chimică de testat 1**			**Substanța chimică de testat 2**			**Substanța chimică de testat 3**			**Substanța chimică de testat 4**		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼M8

Rând	Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2			Substanța chimică de testat 3			Substanța chimică de testat 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO); MP: Martor pozitiv (1 nM E2)

Tabelul 5

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a standardelor de referință pe placa de testare în cadrul testului de antagonist ER

Rând	Tamoxifen			Flutamidă			Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO), MP: Martor pozitiv (1 nM E2), OHT :4-hidroxitamoxifen, Dig: digitonină.

= completat cu 25 pM E2

28. Pentru a evalua activitatea de antagonist a substanțelor chimice, în godeurile de analiză de pe rândurile A-G ar trebui să se introducă 25 pm E2. Standardele de referință (tamoxifen și flutamidă) ar trebui să fie testate la fiecare testare. Godeurile cu MP tratate cu 1 nM de E2 care pot fi utilizate în vederea controlului calității liniei celulare hERα-HeLa-9 903, godeurile cu VC tratate cu DMSO (sau un solvent adecvat), godeurile cu 0,1 % DMSO tratate cu adăugare de DMSO la E2 completat corespunzător cu „Spike-in-control” , godeurile tratate cu o concentrație finală de 1 µM OHT și godeuri tratate cu 100 µM Dig ar trebui să fie adăugate la fiecare placă de testare (tabelul 5). Placa de testare ulterioară ar trebui să urmeze același plan de aranjare a plăcii fără godeuri standard de referință (tabelul 6). Dacă se utilizează celule din surse diferite (de exemplu, un număr de trecere diferit, un lot diferit etc.) în cadrul aceluiași experiment, ar trebui să se testeze standardele de referință pentru fiecare sursă celulară.

▼M8

Tabelul 6

Exemplu de distribuire pe concentrații pe placă a substanțelor chimice martor pe placa de testare în cadrul analizei de antagonist ER

Rând	Substanța chimică de testat 1			Substanța chimică de testat 2			Substanța chimică de testat 3			Substanța chimică de testat 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	MP	→	→	→	→	→

VC: Martor cu vehicul (0,1 % DMSO), MP: Martor pozitiv (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifen, Dig: digitonină.

: Completat cu 25 pM E2

29. Lipsa efectelor extreme ar trebui să fie confirmată, după caz, iar dacă se suspectează prezența acestora, modul de aranjare pe placă ar trebui să fie schimbat pentru a evita astfel de efecte. De exemplu, se poate utiliza un mod de aranjare pe placă care să excludă godeurile de pe margini.

30. După adăugarea substanțelor chimice, plăcile de testare ar trebui să fie incubate într-un incubator de 5 % CO2 la temperatura de 37 ± 1 °C pentru 20-24 de ore pentru a induce produsele genei reporter.

31. Pentru compușii care sunt foarte volatili va fi necesar să se aplice considerații speciale. În astfel de cazuri, godeurile cu martori din apropiere pot genera valori fals pozitive și acest lucru ar trebui să fie analizat în contextul valorilor estimate și a celor istorice ale martorilor. În cele câteva cazuri în care volatilitatea poate fi o problemă, ar putea fi util să se recurgă la „agenți de etanșeizare a plăcii” pentru a izola în mod eficace godeurile individuale în timpul testării și, prin urmare, aceștia sunt recomandați în astfel de cazuri.

32. Ar trebui să se efectueze teste definitive repetate pentru aceeași substanță chimică în zile diferite, pentru asigurarea independenței.

Analiza luciferazei

33. Pentru efectuarea analizei poate fi utilizat un reactiv de analiză a luciferazei din comerț [de exemplu, Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 sau un produs echivalent)] sau un sistem de analiză a luciferazei standard (de exemplu, Promega, E1500 sau un produs echivalent), atâta timp cât sunt îndeplinite criteriile de acceptabilitate. Reactivii de analiză ar trebui să fie selectați pe baza sensibilității luminometrului care va fi utilizat. Atunci când se utilizează sistemul de analiză a luciferazei standard, ar trebui să se utilizeze Cell Culture Lysis Reagent (de exemplu, Promega, E1531 sau un produs echivalent) înainte de adăugarea substratului. Reactivul de luciferază ar trebui să fie aplicat conform instrucțiunilor producătorului.

ANALIZA DATELOR

Testul de agonist ER

34. În cazul testului de agonist ER, pentru a obține activitatea transcripțională relativă pe MP (1 nM de E2), se pot analiza semnalele de luminiscență de la aceeași placă cu respectarea următoarelor etape (sunt acceptabile, de asemenea, alte procese matematice echivalente):

Etapa 1. Se calculează valoarea medie pentru VC.

▼M8

Etapa 2. Se scade valoarea medie a VC din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3. Se calculează media valorii MP normalizate.

Etapa 4. Se împarte valoarea normalizată a fiecărui godeu din placă la media valorii MP normalizate (MP = 100 %).

Valoarea finală a fiecărui godeu constituie activitatea transcripțională relativă pentru godeul respectiv în comparație cu răspunsul MP.

Etapa 5. Se calculează valoarea medie a activității transcripționale relative pentru fiecare grup de concentrații al substanței chimice de testat. Există două dimensiuni la răspuns: media activității transcripționale (răspuns) și concentrația la care se produce răspunsul (a se vedea secțiunea următoare).

Considerații privind inducția EC_{50}, PC_{50} și PC_{10}

35. Curba concentrație-răspuns completă este necesară pentru calcularea EC50, dar este posibil ca acest lucru să nu fie întotdeauna realizabil sau practic din cauza limitărilor intervalului de concentrații de testare (de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate). Însă, întrucât EC50 și nivelul maxim de inducție (corespunzător valorii superioare a ecuației Hill) sunt parametri informativi, acești parametri ar trebui să fie consemnați, dacă este posibil. Pentru calcularea EC50 și a nivelului maxim de inducție ar trebui să se utilizeze un software adecvat de statistică (de exemplu, software-ul statistic Graphpad Prism). În cazul în care ecuația logistică a lui Hill este aplicabilă pentru datele de răspuns la concentrații, valoarea EC50 ar trebui să fie calculată prin următoarea ecuație (7):

Y=Inferior+ (Superior-Inferior) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x panta Hill)) unde:

X este logaritmul concentrației; și,

Y este răspunsul și Y pornește din partea inferioară și ajunge în partea superioară într-o curbă sigmoidă. Partea inferioară este fixată la zero în ecuația logistică a lui Hill.

36. Pentru fiecare substanță chimică de testat, ar trebui să se prezinte:

valoarea RPCMax care este nivelul maxim de răspuns indus de o substanță chimică de testat, exprimată ca procent din răspunsul indus de 1 nM E2 de pe aceeași placă, precum și PC_{Max} (concentrație asociată cu RPCMax); și

În cazul substanțelor chimice pozitive, concentrațiile care induc PC10 și, dacă este cazul, PC50.

37. Valoarea PCx poate fi calculată prin interpolarea dintre 2 puncte pe axa coordonatelor X-Y, unul situat imediat deasupra și altul imediat sub o valoare PCx. În cazul în care punctele de date situate imediat deasupra și sub valoarea PCx au coordonatele (a, b) și, respectiv, (c, d), atunci valoarea PCx poate fi calculată folosind următoarea ecuație:

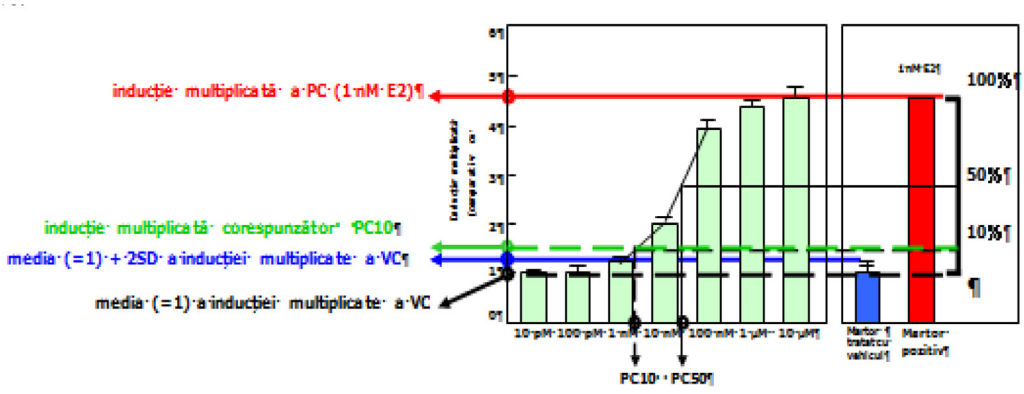
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. Descrierile valorilor PC sunt prezentate în figura 1 de mai jos.

Figura 1

Exemplu de metodă de obținere a valorilor PC. PC (1 nM de E2) se adaugă pe fiecare placă de testare.



Testul de antagonist ER

39. În cazul testului de antagonist ER, pentru a obține activitatea transcripțională relativă (RTA) pentru adăugarea de martor (25 pM de E2), se pot analiza semnalele de luminiscență de la aceeași placă cu respectarea următoarelor etape (sunt acceptabile, de asemenea, alte procese matematice echivalente):

Etapa 1. Se calculează valoarea medie pentru VC.

Etapa 2. Se scade valoarea medie a VC din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele. Etapa 3. Se calculează media martorului de adăugat normalizat.

Etapa 4. Se împarte valoarea normalizată a fiecărui godeu din placă la media valorii martorului de adăugat normalizat (martor de adăugat = 100 %).

Valoarea finală a fiecărui godeu constituie activitatea transcripțională relativă pentru godeul respectiv în comparație cu răspunsul martorului de adăugat.

Etapa 5. Se calculează valoarea medie a activității transcripționale relative pentru fiecare tratament.

Considerații privind inducția IC_{30} și IC_{50}

40. În cazul substanțelor chimice pozitive, ar trebui să se prezinte concentrațiile care induc IC30 și, dacă este cazul, IC50.

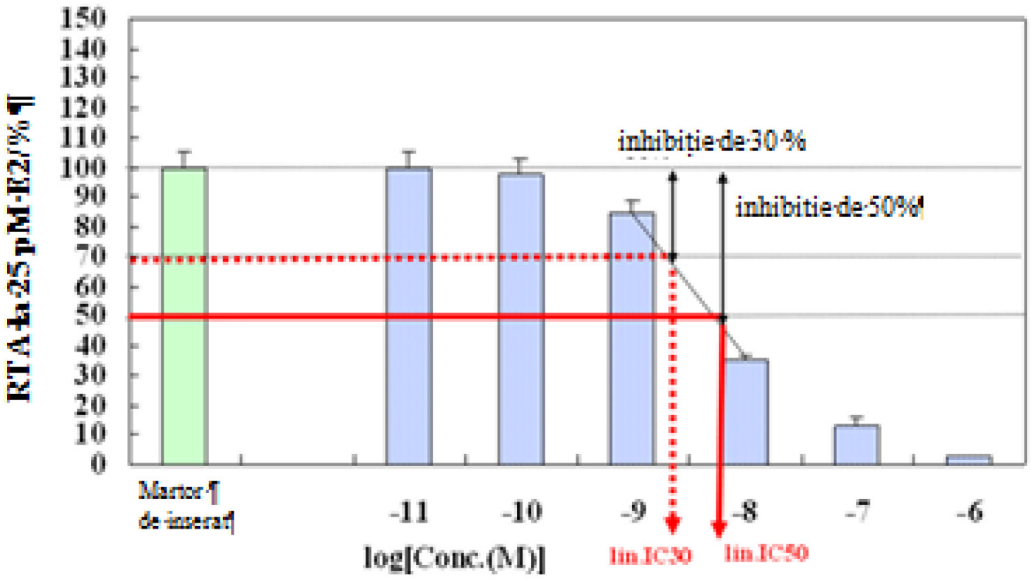
41. Valoarea ICx poate fi calculată prin interpolarea dintre 2 puncte pe axa coordonatelor X-Y, unul situat imediat deasupra și altul imediat sub o valoare ICx. În cazul în care punctele de date situate imediat deasupra și sub valoarea ICx au coordonatele (c, d) și, respectiv, (a, b), atunci valoarea ICx poate fi calculată folosind următoarea ecuație:

în ICx = a-[b-(100-x)] (a-c) /(b-d)

▼M8

Figura 2

Exemplu de metodă de obținere a valorilor IC. Martorul de adăugat (25 nM de E2) se adaugă pe fiecare placă de testare.



RTA: activitate transcripțională relativă

42. Rezultatele ar trebui să fie bazate pe două (sau trei) testări independente. Dacă două testări generează rezultate comparabile și, prin urmare, reproductibile, nu este necesar să se efectueze o a treia testare. Pentru ca rezultatele să fie acceptabile, acestea ar trebui:

— să îndeplinească criteriile de acceptabilitate (a se vedea Criteriile de acceptabilitate de la punctele 14-20),

— să fie reproductibile.

Criterii de interpretare a datelor

Tabelul 7

Criterii de decizie pozitivă și negativă în testul de agonist ER

Pozitivă	În cazul în care se obține o valoare RPC_{Max} mai mare decât sau egală cu 10 % din răspunsul martorului pozitiv în cel puțin două din două sau două din trei testări.
Negativă	În cazul în care valoarea RPC_{Max} nu ajunge la cel puțin 10 % din răspunsul martorului pozitiv în două din două sau două din trei testări.

Tabelul 8

Criterii de decizie pozitivă și negativă în testul de antagonist ER

Pozitivă	Dacă valoarea IC30 este calculată în cel puțin două din două sau două din trei testări.
Negativă	Dacă valoarea IC30 nu este calculată în două din două sau două din trei testări.

▼M8

43. Criteriile de interpretare a datelor sunt prezentate în tabelele 7 și 8. Rezultatele pozitive vor fi caracterizate atât prin amploarea efectului, cât și prin concentrația la care se produc efecte. Exprimarea rezultatelor ca o concentrație la care se atinge 50 % (PC50) sau 10 % (PC10) din valorile PC pentru testul de agonist, iar 50 % (IC50) sau 30 % (IC30) din valoarea martorului de adăugat este inhibată pentru testul antagonist, înseamnă că sunt îndeplinite ambele obiective. Cu toate acestea, o substanță chimică de testat este considerată a fi pozitivă dacă răspunsul maxim indus de substanța chimică de testat (RPCMax) este mai mare decât sau egal cu 10 % din PC în cel puțin două din două sau două din trei testări, iar o substanță chimică de testat este considerată a fi negativă în cazul în care RPCMax nu reușește să atingă cel puțin 10 % din răspunsul martorului pozitiv în două din două sau două din trei teste.

44. Calculele pentru PC10, PC50 and PCMax în testul de agonist ER și IC30 și IC50 în testul antagonist ER al ER pot fi realizate utilizând o fișă disponibilă împreună cu Orientarea privind testarea pe site-ul public al OCDE ([1]).

45. Ar trebui să fie suficient să se obțină valori ale PC10 sau PC50 și IC30 sau IC50 cel puțin de două ori. Însă, în cazul în care valoarea de referință rezultată pentru date din același interval de concentrații indică o variabilitate cu un coeficient inacceptabil de ridicat de variație (CV; %), este posibil ca datele să nu fie considerate fiabile și ar trebui să se identifice sursa variabilității ridicate. Valoarea CV a datelor brute triple (și anume, date privind intensitatea luminiscenței) ale punctelor de date care sunt utilizate pentru calcularea PC10 ar trebui să fie sub 20 %.

46. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate indică faptul că sistemul de analiză funcționează corect, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Duplicarea rezultatelor primei testări reprezintă cea mai bună asigurare a faptului că au fost generate date precise.

47. În cazul testului de agonist ER, unde sunt necesare mai multe informații, în plus față de scopurile de depistare și stabilire a priorităților ale prezentei TG pentru substanțele chimice pozitive, în special pentru substanțele chimice PC10-PC49, precum și pentru substanțe chimice suspectate a suprastimulata luciferaza, se poate confirma că activitatea de luciferază observată este doar un răspuns specific ERα, folosind un antagonist ERα (a se vedea apendicele 2.1).

RAPORTUL TESTULUI

48. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 225), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. și Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. și Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼M8

Apendicele 2.1

REZULTATE FALS POZITIVE: EVALUAREA SEMNALELOR DE LUMINISCENȚĂ CARE NU SUNT MEDIATE DE RECEPTORI

1. Rezultatele pozitive false din analiza activității agoniste a ER ar putea fi generate prin activarea nemediată de ER a genei luciferază sau prin activarea directă a produsului genei sau prin fluorescență nespecifică. Astfel de efecte sunt indicate printr-o curbă incomplete doză-răspuns incompletă sau neobișnuită. Dacă se suspectează existența unor astfel de efecte, ar trebui să se examineze efectul unui antagonist al ER (de exemplu, 4-hidroxitamoxifen (OHT) la o concentrație netoxică) asupra răspunsului. Este posibil ca antagonistul ICI 1827 80 pur să nu fie adecvat pentru acest scop, deoarece o concentrație suficientă de ICI 1827 80 ar putea diminua valoarea VC, iar acest lucru va afecta analiza datelor.

2. Pentru a asigura validitatea acestei abordări, următoarele trebuie să fie testate pe aceeași placă:

   — Activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute cu/fără 10 μM de OHT

   — VC (în trei probe)

   — OHT (în trei probe)

   — 1 nM de E2 (în trei probe) ca și agonist al PC

   — 1 nM de E2 + OHT (în trei probe)

Criterii de interpretare a datelor

Notă: Toate godeurile ar trebui să fie tratate cu aceeași concentrație de vehicul.

— Dacă activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute NU este afectată de tratamentul cu antagonistul ER, aceasta este clasificată ca fiind „Negativă”.

— Dacă activitatea agonistă a substanței chimice necunoscute este complet inhibată, se aplică criteriile de decizie.

— Dacă activitatea agonistă la cea mai scăzută concentrație este egală cu sau mai mare decât răspunsul PC10, substanța chimică necunoscută este inhibată în valoare egală cu sau mai mare decât răspunsul PC10. Se calculează diferența dintre răspunsurile dintre godeurile netratate și cele tratate cu antagonistul ER, iar această diferență ar trebui să fie considerată ca fiind răspunsul real și ar trebui utilizată pentru calcularea parametrilor adecvați pentru a permite luarea unei decizii de clasificare.

Analiza datelor

Se verifică standardul de performanță.

Se verifică valorile VC dintre godeurile tratate în aceleași condiții.

1. Se calculează media VC

2. Se scade media VC din valoarea fiecărui godeu care **nu** este tratat cu OHT

3. Se calculează media OHT

4. Se scade media VC din valoarea fiecărui godeu care este tratat cu OHT

5. Se calculează media PC

6. Se calculează activitatea transcripțională relativă a tuturor celorlalte godeuri în raport cu PC.

▼**M8**

Apendicele 2.2

PREPARAREA SERULUI TRATAT CU CĂRBUNE ACOPERIT CU DEXTRAN (DCC)

1. Tratarea serului cu cărbune acoperit cu dextran (DCC) este o metodă generală de îndepărtare a compușilor estrogeni din serul care se adaugă în mediul celular, pentru a exclude un răspuns subiectiv asociat cu estrogeni reziduali din ser. un volum de 500 ml de ser fetal bovin (FBS) poate fi tratat prin această procedură.

Componente

2. Vor fi necesare următoarele materiale și aparate:

Materiale

Cărbune activ

Dextran

Clorură de magneziu hexahidrat (MgCl2·6H2O)

Zaharoză

1 M soluție tampon HEPES (pH 7,4)

Apa ultrapură obținută printr-un sistem de filtrare

Aparatură

Un recipient din sticlă autoclavizat (dimensiunea ar trebui să fie adaptată, după caz) General Laboratory Centrifuge (care poate stabili temperatura la 4 °C)

Procedura

3. Următoarea procedură este adaptată pentru utilizarea de eprubete pentru centrifugă de 50 ml:

[Ziua 1] Se prepară suspensia din cărbune acoperit cu dextran cu 1 l de apă ultrapură care conține 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 M zaharoză, 2,5 g de cărbune, 0,25 g de dextran și 5 mM de HEPES și se agită la 4 °C peste noapte.

[Ziua 2] Se golește suspensia într-o eprubetă pentru centrifugă de 50 ml și se centrifughează la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute. Se îndepărtează supranatantul și se păstrează jumătate din sedimentul cu cărbune la 4 °C pentru a fi utilizat în Ziua 3. Cealaltă jumătate din cantitatea de cărbune cu FBS care a fost decongelată încet pentru a se evita precipitarea și inactivată termic la 56 °C timp de 30 de minute se suspendă, apoi se transferă într-un recipient din sticlă autoclavizat, cum ar fi un balon Erlenmeyer. Se agită ușor această suspensie la 4 °C, peste noapte.

[Ziua 3] Se golește suspensia cu FBS în eprubete pentru centrifugă pentru centrifugare la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute. FBS este colectat și transferat în noul sediment de cărbune preparat și păstrat în Ziua 2. Se suspendă sedimentul cu cărbune și se agită ușor această suspensie într-un recipient din sticlă autoclavizat la 4 °C, peste noapte.

[Ziua 4] Se golește suspensia pentru centrifugare la 10 000 rpm la 4 °C timp de 10 minute și se sterilizează supernatantul prin filtrare printr-un filtru steril de 0,2 μm. Acest FBS tratat cu DCC ar trebui să fie păstrat la o temperatură de -20 °C și poate fi utilizat pe o perioadă de maxim un an.

▼**M8**

Apendicele 3

ANALIZA DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI DE ESTROGEN VM7LUC PENTRU IDENTIFICAREA AGONIŞTILOR şI ANTAGONIŞTILOR RECEPTORILOR DE ESTROGEN

CONSIDERAŢII ŞI LIMITĂRI INIŢIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză utilizează linia celulară VM7Luc4E2 ([1]). Aceasta a fost validată de National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICAETM) şi de Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Liniile celulare VM7Luc exprimă în mod predominant o valoare ERα endogenă şi o cantitate redusă de ERβ endogenă (2) (3) (4).

2. Această analiză este aplicabilă pentru o gamă largă de substanţe, cu condiţia ca acestea să poată fi dizolvate în dimetilsulfoxid (DMSO; CASRN 67-68-5), să nu reacţioneze cu DMSO sau cu mediul de cultură a celulelor şi să nu fie citotoxice la concentraţiile care sunt testate. Dacă nu este posibilă utilizarea DMSO, se poate utiliza un alt vehicul cum ar fi etanolul sau apa (a se vedea punctul 12). Performanţa demonstrată a analizei activităţii agoniste (antagoniste) VM7Luc ER TA sugerează faptul că datele generate prin această analiză ar putea oferi informaţii cu privire la mecanismele de acţiune mediate de ER şi ar putea fi luate în considerare la stabilirea priorităţii substanţelor prevăzute pentru teste suplimentare.

3. Această analiză este concepută special pentru a detecta TA mediată de hERα şi hERß prin măsurarea chemiluminiscenţei ca punct final. Utilizarea chemiluminiscenţei în bio-analize este larg răspândită, deoarece luminiscenţa are un raport semnal/fond ridicat. Însă activitatea luciferazei de licurici în analizele bazate pe celule poate fi confundată de substanţe care inhibă enzima luciferază, cauzând inhibarea aparentă sau luminiscenţa crescută ca urmare a stabilizării proteinelor. În plus, în unele analize pe gene reporter ER bazate pe luciferază au fost raportate semnale de luminescenţă nemediate de receptori la concentraţii de fitoestrogen mai mari de 1 μM din cauza supra-activării genei luciferază reporter. În timp ce curba doză-răspuns indică faptul că o reală activare a sistemului ER se produce la concentraţii mai mici, expresia luciferazei obţinută la concentraţii ridicate de fitoestrogeni sau compuşi similari susceptibili de a produce o supra-activare a genei luciferază reporter similară fitoestrogenilor trebuie să fie atent examinată în cadrul sistemelor de testare ER TA transfectat stabil.

4. Ar trebui să se parcurgă secţiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” şi „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definiţiile şi abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

([1]) Înainte de iunie 2016, această linie celulară a fost desemnată drept linia celulară BG1Luc. Celulele BG-1 au fost iniţial descrise de Geisinger et al. (1998) (12) şi au fost caracterizate ulterior de cercetători din cadrul Institutului Naţional de Ştiinţe ale Sănătăţii Mediului (NIEHS) (13). Relativ recent, s-a descoperit că există două variante diferite de celule BG-1 utilizate de cercetători, şi anume, BG-1 Fr şi BG-1 NIEHS. O analiză aprofundată, inclusiv o testare ADN, a acestor două linii celulare variante BG-1, care a fost efectuată de Li şi colaboratorii (2014) (14), a arătat că BG-1 Fr este unică şi că BG-1 NIEHS, adică linia celulară iniţială utilizată pentru test, nu era linia celulară BG1 de carcinom ovarian la om, ci era, în schimb, o variantă a liniei celulare MCF7 de cancer de sân la om. Linia celulară utilizată în cadrul testului, denumită iniţial BG1Luc4E2 (15), va fi denumită acum VM7Luc4E2 („V” = variantă; „M7” = celule MCF7). De asemenea, testul va fi denumit acum VM7Luc ER TA. Deşi prin aceasta se modifică originea liniei celulare pe care se bazează testul, acest lucru nu afectează studiile de validare publicate şi nici utilitatea şi aplicarea acestui test pentru depistarea substanţelor chimice estrogenice/anti-estrogenice.

▼M8

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza este utilizată pentru a indica legarea ligand de ER, urmată de translocarea complexului receptor-ligand în nucleu. În nucleu, complexul receptor-ligand se leagă de aumite elemente de răspuns ADN și transactivează gena reporter (*luc*), determinând producerea luciferazei și emisia ulterioară de lumină, care poate fi cuantificată cu ajutorul unui luminometru. Activitatea luciferazei poate fi evaluată rapid și cu costuri reduse cu ajutorul unei serii de truse de testare disponibile în comerț. Analiza VM7Luc ER TA utilizează o linie celulară de adenocarcinom de sân umană reactivă, VM7, care a fost transfectată în mod stabil cu o structură de reporter *luc* de licurici sub controlul a patru elemente de răspuns estrogen așezate în amonte de promotorul virusului tumoral mamar la șoarece (MMTV) pentru a detecta substanțe cu activitate agonistă sau antagonistă ER *in vitro*. Acest promotor MMTV prezintă doar o reactivitate încrucișată minoră cu alți hormoni steroizi și nesteroizi (8). Criteriile pentru interpretarea datelor sunt descrise în detaliu la punctul 41. Pe scurt, un răspuns pozitiv este identificat prin curba concentrație-răspuns care conține cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun (media ± SD), precum și o variație a amplitudinii (unitate de lumină relativă normalizată [RLU]) de cel puțin 20 % din valoarea maximă pentru standardul de referință (17β-estradiol [E2; CASRN 50-28-2] pentru analiza activității agoniste, raloxifen HCl [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 pentru analiza activității antagoniste).

PROCEDURA

Linia celulară

6. Pentru analiză ar trebui să se utilizeze linia celulară VM7Luc4E2 transfectată stabil. În prezent, linia celulară este disponibilă doar prin intermediul unui acord tehnic de licență de la Universitatea din California, Davis, California, SUA ([1]) și de la Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA ([2]).

Stabilitatea liniei celulare

7. Pentru a menține stabilitatea și integritatea liniei celulare, celulele ar trebui să fie cultivate pentru mai multe pasaje din stocul congelat în mediu de păstrare a celulelor (a se vedea punctul 9). Celulele nu ar trebui să fie cultivate pentru mai mult de 30 de pasaje. Pentru linia celulară VM7Luc4E2, 30 de pasaje vor însemna o durată de aproximativ trei luni.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

8. Ar trebui să fie urmate procedurile prevăzute în Orientarea privind bunele practici de cultură a celulelor (5) (6) pentru a asigura calitatea tuturor materialelor și metodelor pentru a menține integritatea, valabilitatea și reproductibilitatea oricărei activități desfășurate.

9. Celulele VM7Luc4E2 sunt menținute în mediu RPMI 1 640, la care se adaugă 0,9 % Pen-Strep și 8,0 % ser fetal bovin (FBS) într-un incubator de cultură tisulară specific la temperatura de 37 °C ± 1°C, 90 % ± 5 % umiditate și 5,0 % ± 1 % CO_2/aer.

10. La atingerea unei confluențe de aproximativ 80 %, celulele VM7Luc4E2 sunt subcultivate și condiționate într-un mediu fără estrogen pentru o perioadă de 48 de ore înainte de introducerea celulelor în plăci cu 96 de godeuri pentru expunerea la substanțe chimice de testat și analiza inducției dependente de estrogen a activității luciferazei. Mediul fără estrogen (EFM)

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, e-mail: info@dioxins.com, telefon: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

▼M8

conține modificarea de către Dulbecco a mediului lui Eagle (DMEM) fără roșu de fenol, la care se adaugă soluție 4,5 % FBS tratat cu cărbune/dextran, 1,9 % L-glutamină și 0,9 % Pen-Strep. Toate articolele din plastic ar trebui să fie fără activitate estrogenă [a se vedea protocolul detaliat (7)].

Criterii de acceptabilitate

11. Acceptarea sau respingerea unui test depinde de evaluarea rezultatelor standardelor de referință și ale martorilor din cadrul fiecărui experiment realizat pe o placă cu 96 de godeuri. Fiecare standard de referință este testat în concentrații multiple și există mai multe eșantioane din fiecare concentrație de referință și martor. Rezultatele sunt comparate cu valorile de control al calității (CC) pentru acești parametri care au fost derivați din bazele de date istorice de agoniști și antagoniști generate de fiecare laborator cu ocazia demonstrării competenței. Bazele de date istorice sunt actualizate permanent cu valori ale standardelor de referință și ale martorilor. Modificările legate de echipamentele sau condițiile de laborator ar putea necesita generarea de baze de date istorice actualizate.

Testarea activității agoniste

Testul pentru identificarea intervalului

- Inducție: Inducția plăcii ar trebui să fie măsurată prin împărțirea valorii medii a celei mai mari unități de lumină relativă standard de referință (RLU) E2 la valoarea medie a RLU cu martor DMSO. De obicei, se obține o inducție multiplicată de cinci ori, dar, în scopul acceptării, inducția ar trebui să fie mai mare decât sau egală cu valoarea multiplicată de patru ori.

- Rezultatele martorului DMSO: Valorile RLU ale martorului tratat cu solvent ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului tratat cu solvent.

- Un experiment care nu îndeplinește niciunul dintre criteriile de acceptare ar trebui să fie eliminat și repetat.

Testul complex

Acesta include criterii de acceptabilitate din testul de identificare a intervalului de activitate agonistă și următoarele:

- Rezultatele standardelor de referință: Curba standard de referință E2 concentrație-răspuns ar trebui să aibă o formă sigmoidală și cel puțin trei valori în porțiunea lineară a curbei concentrație-răspuns.

- Rezultatele martorului pozitiv: Valorile RLU ale martorului metoxiclor ar trebui să fie peste media DMSO plus de trei ori abaterea standard de la media DMSO.

- Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare ar trebui să fie eliminat și repetat.

Testul activității antagoniste

Testul pentru identificarea intervalului

- Reducție: Reducția plăcii este măsurată prin împărțirea valorii medii RLU standard de referință Ral/E2 la valoarea medie a RLU cu martor DMSO. De obicei, se obține o reducție multiplicată de cinci ori, dar, în scopul acceptării, reducția ar trebui să fie mai mare decât sau egală cu valoarea multiplicată de trei ori.

- Rezultatele martorului E2: Valorile RLU ale martorului E2 ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului E2.

▼M8

- Rezultatele martorului DMSO: Valorile RLU ale martorului DMSO ar trebui să fie în limita de 2,5 ori abaterea standard a valorii medii istorice RLU a martorului tratat cu solvent.

- Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare va fi eliminat și repetat.

Testul complex

Acesta include criterii de acceptare din testul de identificare a intervalului de activitate antagonistă și următoarele:

- Rezultatele standardelor de referință: Curba standard de referință Ral/E2 concentrație-răspuns ar trebui să aibă o formă sigmoidală și cel puțin trei valori în porțiunea lineară a curbei concentrație-răspuns.

- Rezultatele martorului pozitiv: Valorile RLU ale martorului tamoxifen/E2 ar trebui să fie sub media martorului E2 minus de trei ori abaterea standard de la media martorului E2.

- Un experiment care nu îndeplinește oricare dintre criteriile de acceptare va fi eliminat și repetat.

Standarde de referință, martori pozitivi și martori tratați cu vehicule

Martor tratat cu vehicul (analize ale activității agoniste și antagoniste)

12. Vehiculul care se utilizează pentru a dizolva substanțele chimice de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu vehicul. Vehiculul utilizat în timpul validării analizei VM7Luc ER TA a fost de 1 % (v/v) dimetilsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) (a se vedea punctul 24). Dacă se utilizează un alt vehicul decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul, dacă este cazul.

Standard de referință (identificatorul intervalului pentru activitate agonistă)

13. Standardul de referință este E2 (CASRN 50-28-2). Pentru testul de identificare a intervalului, standardul de referință constă într-o diluție în serie de patru concentrații de E2 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ și $2,87 \times 10^{-12}$ M), fiecare concentrație fiind testată în godeuri duplicate.

Standard de referință (testul complex pentru activitate agonistă)

14. E2 pentru testare complexă cuprinde o diluție în serie de 1:2 constând în 11 concentrații (cuprinse între $3,67 \times 10^{-10}$ și $3,59 \times 10^{-13}$ M) de E2 în godeuri duplicate.

Standard de referință (identificatorul intervalului pentru activitate antagonistă)

15. Standardul de referință reprezintă o combinație de Ral (CASRN 84 449-90-1) și E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 pentru testul de identificare a intervalului cuprinde o diluție în serie din trei concentrații de Ral ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ și $1,92 \times 10^{-10}$M) plus o concentrație fixă ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de E2 în godeuri duplicate.

Standard de referință (testul complex pentru activitate antagonistă)

16. Ral/E2 pentru testul complex cuprinde o diluție în serie 1:2 de Ral (între $2,45 \times 10^{-8}$ și $9,57 \times 10^{-11}$M) plus o concentrație fixă ($9,18 \times 10^{-11}$ M) de E2 care cuprinde nouă concentrații de Ral/E2 în godeuri duplicate.

Martor slab pozitiv (agonist)

17. Martorul slab pozitiv este $9,06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoxiclor (metoxiclor; CASRN 72-43-5) în EFM.

▼M8

Martor slab pozitiv (antagonist)

18. Martorul slab pozitiv constă în tamoxifen (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M cu 9,18 × 10^{-11} M E2 în EFM.

Martorul E2 (doar analiza activității antagoniste)

19. Martorul E2 este 9,18 × 10^{-11} M E2 din EFM și este utilizat ca martor negativ de referință.

Inducție multiplicată (agonist)

20. Inducția activității luciferazei la standardul de referință (E2) se măsoară prin împărțirea mediei celei mai mari valori RLU a standardului de referință E2 la valoarea medie RLU a martorului DMSO, iar rezultatul ar trebui să fie mai mare decât valoarea multiplicată de patru ori.

Inducție multiplicată (antagonist)

21. Activitatea medie a luciferazei la standardul de referință (Ral/E2) se măsoară prin împărțirea mediei celei mai mari valori RLU a standardului de referință Ral/E2 la valoarea medie RLU a martorului DMSO și ar trebui să fie mai mare decât valoarea multiplicată de trei ori.

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA” din prezenta metodă de testare).

Vehicul

22. Substanțele chimice de testat ar trebui să se dizolve într-un solvent care solubilizează substanța chimică de testat și este miscibil cu mediul celular. Vehicule adecvate sunt apa, etanolul (puritate de 95-100 %) și DMSO. În cazul în care se utilizează DMSO, nivelul nu ar trebui să depășească 1 % (v/v). Pentru orice vehicul, ar trebui să se demonstreze că volumul maxim utilizat nu este citotoxic și nu interferează cu performanțele testului. Standardele de referință și martorii sunt dizolvați în solvent 100 %, apoi diluați în concentrații corespunzătoare în EFM.

Prepararea substanțelor chimice de testat

23. Substanțele chimice de testat sunt dizolvate în DMSO 100 % (sau un solvent adecvat), apoi diluate în concentrații corespunzătoare în EFM. Toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie lăsate să se echilibreze la temperatura camerei înainte de a fi dizolvate și diluate. Soluțiile cu substanțe chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment. Soluțiile nu ar trebui să prezinte precipitat sau tulburare vizibilă. Stocurile de standarde de referință și de martori pot fi preparate în cantitate mare; însă, standardul de referință final, diluțiile cu martori și substanțele chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment și utilizate în termen de 24 de ore de la preparare.

Solubilitate și citotoxicitate: Considerații pentru identificarea intervalului

24. Testul de identificare a intervalului constă în diluții în serie de 1:10 în șapte puncte testate în duplicat. Inițial, substanțele chimice de testat sunt testate până la concentrația maximă de 1 mg/ml (~ 1 mM) pentru testarea activității agoniste și de 20 μg/ml (~10μM) pentru testarea activității antagoniste. Sunt utilizate experimente de identificare a intervalului pentru a determina următoarele:

— Concentrațiile inițiale ale substanței chimice de testat care urmează să fie utilizate în timpul testării complexe

— Diluțiile substanței chimice de testat (1:2 sau 1:5) care urmează să fie utilizate în timpul testării complexe

▼M8

25. O evaluare a viabilității/citotoxicității celulare este inclusă în protocoalele de analiză a activității agoniste și antagoniste (7) și este integrată în testul de identificare a intervalului și în testul complex. Metoda de citotoxicitate folosită pentru a evalua viabilitatea celulară în timpul validării VM7Luc ER TA (1) a fost o metodă de observare vizuală calitativă dimensionată; însă, se poate utiliza o metodă cantitativă pentru determinarea citotoxicității [a se vedea protocolul (7)]. Datele privind concentrațiile substanțelor chimice de testat care provoacă o reducere mai mare de 20 % a viabilității nu pot fi utilizate.

Expunerea la substanțe chimice de testat și organizarea plăcilor pentru testare

26. Celulele sunt numărate și așezate pe plăcile de cultură tisulară cu 96 de godeuri (2 x 10^5 de celule pe godeu) în EFM și incubate timp de 24 de ore pentru a permite celulelor să se prindă de placă. EFM este eliminat și înlocuit cu substanțe chimice de testat și de referință în EFM și incubat timp de 19-24 de ore. Va fi necesar să se acorde o atenție specială substanțelor extrem de volatile, întrucât godeurile cu martori din apropiere ar putea genera rezultate fals pozitive. În astfel de cazuri, „agenții de etanșeizare a plăcii" ar putea ajuta la izolarea godeurilor individuale în timpul testării și, prin urmare, se recomandă.

Testele pentru identificarea intervalului

27. În testul pentru identificarea intervalului sunt folosite toate cele 96 de godeuri de pe placă pentru a testa până la șase substanțe chimice de testat ca diluții de 1:10 în serie în șapte puncte în duplicat (a se vedea figurile 1 și 2).

— Testul pentru identificarea intervalului *agonistului* folosește patru concentrații ale E2 în duplicat ca standard de referință și patru godeuri duplicate pentru martorul DMSO.

— Testul pentru identificarea intervalului *antagonistului* folosește trei concentrații ale Ral/E2 cu 9,18 × 10^{-11} M E2 în duplicat ca standard de referință și trei godeuri duplicate pentru martorii E2 și DMSO.

Figura 1

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul pentru identificarea intervalului agonistului

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abrevieri: E2-1-E2-4 = concentrațiile standardului de referință E2 (în ordine descrescătoare); TC1-1-TC1-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); TC3-1-TC3-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 3 (TC3); TC4-1-TC4-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 4 (TC4); TC5-1-TC5-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 5 (TC5); TC6-1-TC6-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 6 (TC6); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).

▼M8

Figura 2

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul pentru identificarea intervalului antagonistului

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abrevieri: E2 = martorul E2; Ral-1-Ral-3 = concentrațiile standardului de referință raloxifen/E2 (în ordine descrescătoare); TC1-1-TC1-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); TC3-1-TC3-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 3 (TC3); TC4-1-TC4-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 4 (TC4); TC5-1-TC5-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 5 (TC5); TC6-1-TC6-7 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 6 (TC6); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Notă: Toate substanțele chimice de testat sunt testate în prezența M E2 9,18 × 10-11.

28. Volumul final recomandat de medii necesar pentru fiecare godeu este de 200 µl. Se utilizează numai plăci de testare în care celulele din toate godeurile prezintă o viabilitate de cel puțin 80 %.

29. Determinarea concentrațiilor inițiale pentru testul complex al ***agonistului*** este descrisă în detaliu în protocolul privind agonistul (7). Pe scurt, se utilizează următoarele criterii:

— Dacă nu există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mari decât media plus de trei ori abaterea standard a martorului DMSO, va fi efectuat un test complex utilizând o diluție în serie 1:2 în 11 puncte pornind de la concentrația maximă solubilă.

— Dacă există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mari decât media plus de trei ori abaterea standard a martorului DMSO, concentrația inițială care trebuie utilizată pentru sistemul de diluare în 11 puncte, în cadrul testului complex, ar trebui să fie cu un log mai mare decât concentrația care indică cea mai mare valoare RLU ajustată în testul de identificare a intervalului. Sistemul de diluare în 11 puncte se va baza pe diluția 1:2 sau 1:5 în conformitate cu următoarele criterii:

Ar trebui să fie utilizată o diluție de 1:2 în serie în 11 puncte dacă intervalul de concentrații rezultant va cuprinde întreaga serie de răspunsuri pe baza curbei concentrație-răspuns generate în cadrul testului de identificare a intervalului. În caz contrar, se utilizează o diluție de 1:5.

▼**M8**

— În cazul în care o substanță chimică de testat prezintă o curbă concentrație-răspuns bifazică în cadrul testului de identificare a intervalului, ambele faze ar trebui să fie abordate, de asemenea, în cadrul testului complex.

30. Determinarea concentrațiilor inițiale pentru testul complex al ***antagonistului*** este descrisă în detaliu în protocolul privind antagonistul (7). Pe scurt, se utilizează următoarele criterii:

— Dacă nu există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mici decât media minus de trei ori abaterea standard a martorului E2, va fi efectuat un test complex utilizând o diluție în serie 1:2 în 11 puncte pornind de la concentrația maximă solubilă.

— Dacă există puncte pe curba concentrațiilor substanței chimice de testat care sunt mai mici decât media minus de trei ori abaterea standard a martorului E2, concentrația inițială care trebuie utilizată pentru sistemul de diluare în 11 puncte, în cadrul testului complex, ar trebui să fie una dintre următoarele:

• concentrația care prezintă cea mai mică valoare RLU ajustată în cadrul testului de stabilire a intervalului

• concentrația maximă solubilă [a se vedea Protocolul privind antagonistul (7), figura 14-2]

• concentrația citotoxică minimă [a se vedea Protocolul privind antagonistul (7), figura 14-3 pentru un exemplu aferent].

— Sistemul de diluare în 11 puncte se va baza pe o diluție 1:2 sau 1:5 în serie sau pe o diluție care respectă următoarele criterii:

Ar trebui să fie utilizată o diluție de 1:2 în serie în 11 puncte dacă intervalul de concentrații rezultant va cuprinde întreaga serie de răspunsuri pe baza curbei concentrație-răspuns generate în cadrul testului de identificare a intervalului. În caz contrar, ar trebui să se utilizeze o diluție de 1:5.

Teste complexe

31. Testul complex constă în diluții în serie în 11 puncte (diluții în serie de 1:2 sau 1:5 pe baza concentrației inițiale pentru criteriile de testare complexă), fiecare concentrație fiind testată în trei godeuri de pe placa cu 96 de godeuri (a se vedea figurile 3 și 4).

— Testul complex privind *agonistul* utilizează 11 concentrații de E2 în duplicat ca standard de referință. Pe fiecare placă sunt incluse patru godeuri replicate pentru martorul DMSO și patru godeuri replicate pentru martorul metoxiclor ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Testul complex al *antagonistului* utilizează nouă concentrații de Ral/E2 cu $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 în duplicat ca standard de referință, cu patru godeuri replicate pentru martorul E2 $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, patru godeuri replicate pentru martorii DMSO și patru godeuri replicate pentru tamoxifen $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

▼M8

Figura 3

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul complex al agonistului

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Abrevieri: TC1-1 - TC1-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1; TC2-1-TC2-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2; E2-1-E2-11 = concentrațiile standardului de referință E2 (în ordine descrescătoare); Meth = martor slab pozitiv metoxiclor p,p'; VC = martor DMSO tratat cu vehicul EFM (1 % v/v)

Figura 4

Distribuția pe placa de 96 de godeuri în testul complex al antagonistului

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abrevieri: E2 = martorul E2; Ral-1-Ral-9 = concentrațiile standardului de referință raloxifen/E2 (în ordine descrescătoare); Tam = Martor slab pozitiv tamoxifen/E2; TC1-1-TC1-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 1 (TC1); TC2-1-TC2-11 = concentrațiile, în ordine descrescătoare, ale substanței chimice de testat 2 (TC2); VC = martor tratat cu vehicul (DMSO [1 % v/v EFM.]).Notă: După cum s-a menționat, toate godeurile de referință și de testare conțin o concentrație fixă de E2 (9,18 x 10-11M).

32. Ar trebui să se efectueze teste complexe repetate pentru aceeași substanță chimică în zile diferite, pentru asigurarea independenței. Ar trebui să se efectueze cel puțin două teste complexe. Dacă rezultatele testelor sunt contradictorii (de exemplu, un test este pozitiv, celălalt negativ) sau dacă unul dintre teste este inadecvat, ar trebui efectuat un al treilea test suplimentar.

Măsurarea luminiscenței

33. Luminiscența este măsurată în intervalul 300-650 nm, cu ajutorul unui luminometru cu injectare și al unui software care controlează volumul de injecție și intervalul de măsurare (7). Emisia de lumină din fiecare godeu este exprimată în RLU pe godeu.

▼M8

ANALIZA DATELOR

Determinarea EC_{50} /IC_{50}

34. Valoarea EC_{50} (jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat [agoniști)] și valoarea IC_{50} (jumătate din concentrația de inhibare maximă a unei substanțe chimice de testat [antagoniști]) sunt determinate din datele concentrație-răspuns. Pentru substanțele chimice de testat care sunt pozitive la una sau mai multe concentrații, concentrația substanței chimice de testat care provoacă un răspuns semi-maximal (IC_{50} sau EC_{50}) se calculează utilizând o analiză a funcției Hill sau o alternativă adecvată. Funcția Hill este un model matematic logistic cu patru parametri care raportează concentrația substanței chimice de testat la răspuns (de regulă, pe baza unei curbe sigmoidale) cu ajutorul ecuației de mai jos:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

Unde:

Y = răspuns (și anume, valori RLU);

X = logaritmul concentrației;

Nivel inferior = răspunsul minim;

Nivel superior = răspunsul maxim;

lg EC_{50} (sau lg IC_{50}) = logaritmul X ca mediana răspunsului între partea superioară și cea inferioară;

Hillslope = caracterul abrupt al curbei.

Modelul calculează cea mai bună încadrare pentru nivelul superior, nivelul inferior, Hillslope și parametrii IC_{50} și EC_{50}. Pentru calcularea valorilor EC_{50} și IC_{50}, ar trebui să se utilizeze un software statistic adecvat (de exemplu, software-ul statistic Graphpad Prism^{R}).

Determinarea valorilor neconforme

35. Un bun raționament statistic ar putea fi facilitat prin includerea, printre altele, a testului Q (a se vedea protocoalele privind agonistul și antagonistul (7) pentru determinarea godeurilor „inutilizabile” care vor fi excluse din analiza datelor.

36. Pentru replicile standardului de referință E2 (mărime eșantion la două replici), orice valoare RLU ajustată pentru o replică la o anumită concentrație de E2 este considerată a fi o valoare neconformă dacă valoarea acesteia este peste sau sub 20 % din valoarea RLU ajustată pentru concentrația respectivă în baza de date istorice.

Colectarea și adaptarea datelor luminometrului pentru testul de stabilire a intervalului

37. Datele brute obținute din luminometru ar trebui să fie transferate pe o fișă model prevăzută pentru analiză. Ar trebui să se stabilească dacă există puncte de date neconforme care ar trebui eliminate. (a se vedea criteriile de acceptare a testului pentru parametrii determinați în cadrul analizelor.) Ar trebui să se efectueze următoarele calcule:

Agonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru martorul cu vehicul DMSO (VC).

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

▼**M8**

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii EC_{50} pentru substanțele chimice de testat.

Antagonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează reducția multiplicată medie pentru standardul de referință (Ral/E2).

Etapa 4 Se calculează valoarea medie a standardului de referință E2.

Etapa 5 Se calculează media valorii IC50 pentru substanțele chimice de testat.

Colectarea și adaptarea datelor luminometrului pentru testul complex

38. Datele brute obținute din luminometru ar trebui să fie transferate pe o fișă model prevăzută pentru analiză. Ar trebui să se stabilească dacă există puncte de date neconforme care ar trebui eliminate. (a se vedea criteriile de acceptare a testului pentru parametrii determinați în cadrul analizelor.) Sunt efectuate următoarele calcule:

Agonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii EC_{50} pentru E2 și substanțele chimice de testat.

Etapa 5 Se calculează media valorii ajustate RLU pentru metoxiclor.

Antagonistul

Etapa 1 Se calculează valoarea medie pentru VC DMSO.

Etapa 2 Se scade valoarea medie a VC DMSO din fiecare valoare a godeului pentru a normaliza datele.

Etapa 3 Se calculează inducția multiplicată medie pentru standardul de referință (Ral/E2).

Etapa 4 Se calculează media valorii IC_{50} pentru Ral/E2 și substanțele chimice de testat.

Etapa 5 Se calculează media valorii ajustate RLU pentru tamoxifen.

Etapa 6 Se calculează valoarea medie a standardului de referință E2.

▼M8

Criterii de interpretare a datelor

39. Testul VM7Luc ER TA este prevăzut în cadrul abordării bazate pe dovezi, pentru a contribui la stabilirea priorității substanțelor la testarea ED *in vivo*. Din această procedură de stabilire a priorităților va face parte clasificarea substanței chimice de testat ca fiind pozitivă sau negativă pentru activitatea agonistă sau antagonistă a ER. Criteriile de decizie pozitivă și negativă utilizate în studiul de validare VM7Luc ER AT sunt descrise în tabelul 1.

Tabelul 1

Criterii de decizie pozitivă și negativă

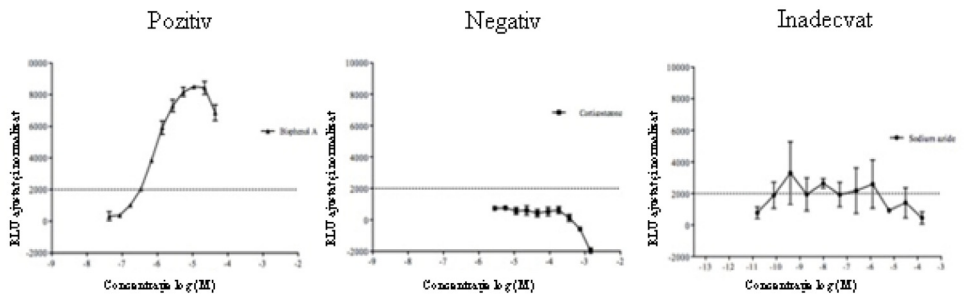
ACTIVITATEA AGONISTĂ	
Pozitivă	— Toate substanțele chimice de testat clasificate ca fiind *pozitive pentru* activitatea agonistă a ER ar trebui să prezinte o curbă concentrație-răspuns care să cuprindă o bază de referință, să urmeze o pantă pozitivă și să culmineze cu un platou sau un vârf. În unele cazuri, pot fi definite numai două dintre aceste caracteristici (bază de referință-pantă sau pantă-vârf). — Linia care definește panta pozitivă ar trebui să conțină cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun (media ± SD). Sunt excluse punctele care alcătuiesc baza de referință, dar porțiunea liniară a curbei poate include vârful sau primul punct al platoului. — O clasificare pozitivă necesită o amplitudine a răspunsului, diferența dintre baza de referință și vârf de cel puțin 20 % din valoarea maximă a standardului de referință E2 [și anume, 2 000 RLU sau mai mult atunci când valoarea maximă de răspuns a standardelor de referință (E2) este ajustată la 10 000 RLU]. — Dacă este posibil, ar trebui să se calculeze o valoare EC_{50} pentru fiecare substanță chimică de testat pozitivă.
Negativă	Valoarea medie ajustată a RLU pentru o concentrație dată este egală cu sau sub valoarea medie RLU a DMSO plus de trei ori abaterea standard a RLU DMSO.
Inadecvată	Datele care nu pot fi interpretate ca fiind valabile pentru a demonstra prezența sau absența activității din cauza limitărilor calitative sau cantitative majore sunt considerate a fi inadecvate și nu pot fi utilizate pentru a determina dacă substanța chimică de testat este pozitivă sau negativă. Substanțele chimice ar trebui să fie testate din nou.
ACTIVITATEA ANTAGONISTĂ	
Pozitivă	— Datele despre substanțele chimice de testat generează o curbă concentrație-răspuns care constă într-o bază de referință, urmată de o pantă negativă. — Linia care definește panta negativă ar trebui să conțină cel puțin trei puncte cu bare de eroare care nu se suprapun; sunt excluse punctele care alcătuiesc baza de referință, dar porțiunea liniară a curbei poate include primul punct al platoului. — Ar trebui să existe o reducere de cel puțin 20 % a activității de la valoarea maximă pentru standardul de referință Ral/E2 [și anume, cel mult 8 000 RLU atunci când valoarea maximă de răspuns a standardului de referință (Ral/E2) este ajustată la 10 000 RLU]. — Cele mai mari concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat ar trebui să fie mai mici decât sau egale cu 1×10^{-5} M. — Dacă este posibil, ar trebui să se calculeze o valoare IC_{50} pentru fiecare substanță chimică de testat pozitivă.
Negativă	Toate punctele de date sunt peste valoarea EC_{80} (80 % din răspunsul E2 sau 8 000 RLU) la concentrații sub $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Inadecvată	Datele care nu pot fi interpretate ca fiind valabile pentru a demonstra prezența sau absența activității din cauza limitărilor calitative sau cantitative majore sunt considerate a fi inadecvate și nu pot fi utilizate pentru a determina dacă substanța chimică de testat este pozitivă sau negativă. Substanța chimică ar trebui să fie testată din nou.

▼**M8**

40. Rezultatele pozitive vor fi caracterizate atât prin amploarea efectului, cât și prin concentrația la care se produc efecte, dacă este posibil. Exemple de date pozitive, negative și inadecvate sunt prezentate în figurile 5 și 6.

Figura 5

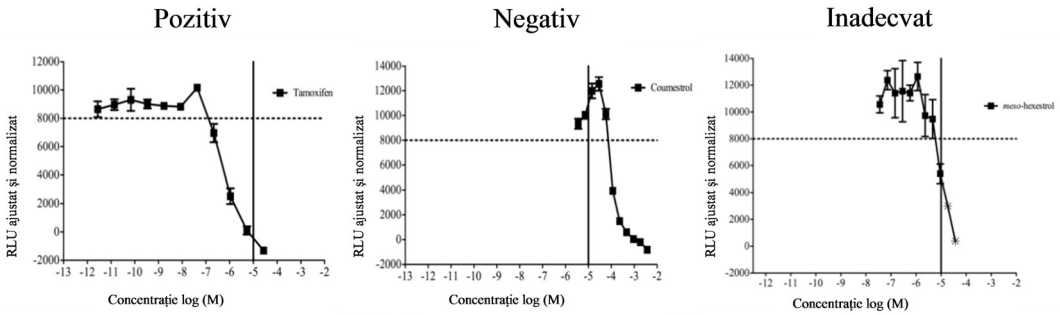
Exemple de agoniști: Date pozitive, negative și inadecvate



Linia întreruptă indică 20 % din răspunsul E2, valoarea de 2 000 RLU ajustată și normalizată.

Figura 6

Exemple de antagonist: Date pozitive, negative și inadecvate



Linia întreruptă indică 80 % din răspunsul Ral/E2, valoarea de 8 000 RLU ajustată și normalizată.

O linie continuă indică 1,00 x 10-5 M. Pentru ca un răspuns să fie considerat pozitiv, acesta ar trebui să se situeze sub valoarea de 8 000 RLU și la concentrații mai mici de 1,00 x 10-5M.

Concentrațiile marcate cu asterisc în graficul pentru mezo-hexestrol indică punctaje de viabilitate de „2” sau mai mari.

Rezultatele testelor pentru mezo-hexestrol sunt considerate date inadecvate deoarece singurul răspuns care se situează sub 8 000 RLU se produce la 1,00 x 10-5M.

41. Calculele EC_{50} și IC_{50} pot fi efectuate utilizând o funcție Hill cu patru parametri [a se vedea Protocolul privind agonistul și protocolul privind antagonistul pentru mai multe detalii (7)]. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate indică faptul că sistemul funcționează corect, dar nu asigură faptul că orice testare specifică va genera date precise. Duplicarea rezultatelor primei testări reprezintă cea mai bună asigurare a faptului că au fost generate date precise (a se vedea punctul 19 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”).

▼**M8**

RAPORTUL TESTULUI

42. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication nr. 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*., 13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology, 17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. și Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼M8

Apendicele 4

TESTUL DE TRANSACTIVARE A RECEPTORULUI A DE ESTROGEN UMAN TRANSFECTAT STABIL PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII AGONISTE ȘI ANTAGONISTE A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE UTILIZEAZĂ LINIA CELULARĂ ERA CALUX

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Analiza de transactivare hERα CALUX utilizează linia celulară umană U2OS pentru a detecta activitatea agonistă și antagonistă estrogenă mediată prin receptorul alfa de estrogen uman (hERα). Studiul de validare a bioanalizei cu transfectare stabilă a ERα CALUX al BioDetection Systems BV (Amsterdam, Țările de Jos) a demonstrat relevanța și fiabilitatea analizei pentru scopul său prevăzut (1). Linia celulară ERα CALUX exprimă doar ERα uman transfectat stabil (2) (3).

2. Această analiză este concepută special pentru a detecta transactivarea mediată de hERα prin măsurarea bioluminiscenței ca punct final. Bioluminiscența este utilizată în mod frecvent în bioanalize datorită ratei semnal-zgomot ridicate (4).

3. Au fost raportate concentrații de fitoestrogen mai mari de 1 μM pentru supra-activarea genei luciferază reporter, determinând o luminescență nemediată de receptor (5) (6) (7). Prin urmare, trebuie să se examineze cu atenție concentrații mai mari de fitoestrogeni sau alți compuși similari care pot să supra-activeze expresia luciferazei în cadrul analizelor de transactivare a ER transfectat stabil (a se vedea apendicele 2).

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „INTRODUCERE GENERALĂ” și „COMPONENTE ALE ANALIZEI ER TA” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Bioanaliza este utilizată pentru a indica legarea ligand de ER, urmată de translocarea complexului receptor-ligand în nucleu. În nucleu, complexul receptor-ligand leagă anumite elemente de răspuns ADN și transactivează o genă luciferază reporter de licurici, ceea ce determină o expresie celulară crescută a enzimei luciferază. Ca urmare a adaosului de luciferină ca substrat pentru luciferază, luciferina se transformă într-un produs bioluminiscent. Lumina produsă poate fi detectată și cuantificată cu ușurință cu ajutorul unui luminometru.

6. Sistemul de testare utilizează celule ERα CALUX transfectate stabil. Celulele ERα CALUX au provenit de la linia celulară umană de osteosarcom osteoblastic U2OS. Celulele U2OS umane au fost transfectate stabil cu 3 x HRE-TATA-Luc și pSG5-neo-hERα, utilizând metoda coprecipitării fosfatului de calciu. Linia celulară U2OS a fost selectată drept cel mai bun candidat pentru a servi ca linie celulară reporter reactivă la estrogen (și alți hormoni steroizi), pe baza observației conform căreia linia celulară U2OS a indicat o activitate redusă a receptorului endogen sau nu a manifestat nicio astfel de activitate. Absența receptorilor endogeni a fost evaluată folosind exclusiv plasmide reporter pentru luciferază, nefiind indicată nicio activitate atunci când au fost adăugați liganzi de receptor. De asemenea, această linie celulară a susținut răspunsuri puternice mediate de hormoni atunci când au fost introduși în mod tranzitoriu receptori conecși (2) (3) (8).

7. Substanțele chimice de testat pentru activitatea estrogenă sau anti-estrogenă, care utilizează linia celulară ERα CALUX, includ un test de depistare prealabilă și teste complexe. În timpul testului de depistare prealabilă, se determină solubilitatea, citotoxicitatea și un interval ajustat de concentrații ale substanțelor chimice de testat pentru testul complex. În timpul testelor

▼M8

complexe, intervalele de concentrații ajustate ale substanțelor chimice de testat sunt testate în cadrul bioanalizelor ERα CALUX, urmate de clasificarea substanțelor chimice de testat pentru agonism sau antagonism.

8. Criteriile pentru interpretarea datelor sunt descrise în detaliu la punctul 59. Pe scurt, o substanță chimică de testat este considerată pozitivă pentru agonism în cazul în care cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat indică un răspuns egal cu sau mai mare de 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință 17β-estradiol (PC_{10}). O substanță chimică de testat este considerată pozitivă pentru antagonism în cazul în care cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat indică un răspuns egal cu sau mai mic de 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință tamoxifen (PC_{80}).

PROCEDURA

Linii celulare

9. Pentru analiză ar trebui să se utilizeze linia celulară ERα CALUX U2OS transfectată stabil. Linia celulară poate fi obținută de la BioDetection Systems BV, Amsterdam, Țările de Jos, împreună cu un acord tehnic de licență.

10. Ar trebui să se utilizeze numai culturi de celule fără micoplasme. Loturile de celule utilizate ar trebui să fie certificate ca fiind negative pentru contaminare cu micoplasmă sau ar trebui să se efectueze un test pentru micoplasme înainte de utilizare. Ar trebui să se recurgă la RT-PCR (reacție de polimerizare în lanț în timp real) pentru detectarea sensibilă a infecției cu micoplasme (9).

Stabilitatea liniei celulare

11. Pentru a menține stabilitatea și integritatea celulelor CALUX, celulele ar trebui să fie păstrate în azot lichid (-80^{0}C). După decongelarea celulelor pentru începerea unei noi culturi, celulele ar trebui să fie subcultivate cel puțin de două ori înainte de a fi utilizate pentru evaluarea activității agoniste și antagoniste estrogene a substanțelor chimice. Celulele nu ar trebui să fie subcultivate pentru mai mult de 30 de pasaje.

12. Pentru a monitoriza stabilitatea liniei celulare în timp, capacitatea de răspuns a sistemului de testare agonistă și antagonistă ar trebui verificată prin evaluarea EC_{50} sau IC_{50} a standardului de referință. În plus, ar trebui să fie monitorizată inducția relativă a eșantionului de martor pozitiv (MP) și a eșantionului de martor negativ (MN). Rezultatele ar trebui să fie în concordanță cu criteriile de acceptare pentru bioanaliza agonistă (tabelul 3C) sau antagonistă ERα CATLUX (tabelul 4C). Standardele de referință, martorii pozitivi și negativi sunt prezentați în tabelele 1 și 2 pentru modul agonist și, respectiv, antagonist.

Cultura celulară și condiții de aranjare pe placă

13. Celulele U2OS ar trebui să fie cultivate în mediu de creștere [DMEM/F12 (1:1) cu roșu de fenol ca indicator al pH-ului, completat cu ser fetal bovin (7,5 %), aminoacizi neesențiale (1 %), 10 unități/ml de penicilină, streptomicină și geneticină (G-418) ca marker de selecție]. Celulele ar trebui să fie introduse într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2) la 37^{0}C și umiditate de 100 %. Atunci când celulele ating o confluență de 85-95 %, acestea ar trebui să fie subcultivate sau pregătite pentru însămânțare în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri. În cazul acestora din urmă, celulele ar trebui să fie resuspendate într-o cantitate de 1 x 10^5 celule/ml în mediu de testare fără estrogen [mediu fără roșu de fenol DMEM/F12 (1:1), la care se adaugă un ser fetal bovin tratat cu dextran și cărbune acoperit (5 % v/v), aminoacizi neesențiali (1 % v/v), 10 unități/ml de penicilină și streptomicină] și introduse în plăcile de microtitrare de 96 de godeuri fiecare (100 µl de suspensie celulară omogenizată). Celulele ar trebui să fie incubate în prealabil într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37^{0}C, umiditate de 100 %) timp de 24 de ore înainte de expunere. Articolele din plastic ar trebui să nu conțină estrogen.

▼M8

Criterii de acceptabilitate

14. Activitatea agonistă și cea antagonistă a substanței (substanțelor) chimice de testat sunt testate în cadrul unei serii de teste. O serie de teste cuprinde maxim șase plăci de microtitrare. Fiecare serie de teste conține cel puțin o serie completă de diluții ale unui standard de referință, un eșantion de martor pozitiv, un eșantion de martor negativ și martori tratați cu solvent. Figurile 1 și 2 prezintă configurația plăcii pentru seriile de teste agoniste și antagoniste.

15. Fiecare diluție a standardelor de referință, a substanțelor chimice de testat, toți martorii tratați cu solvent, precum și martorii pozitivi și negativi ar trebui să fie analizați în trei replici. Fiecare analiză a datelor efectuată în trei replici ar trebui să îndeplinească cerințele prevăzute în tabelele 3A și 4A.

16. Se măsoară o serie completă de diluții ale standardului de referință (17β-estradiol pentru agonism; tamoxifen pentru antagonism) pe prima placă în cadrul fiecărei serii de teste. Pentru a putea compara rezultatele analizelor aferente celor cinci plăci de microtitrare rămase cu prima placă de microtitrare care conține curba concentrație-răspuns completă a standardului de referință, toate plăcile ar trebui să conțină trei eșantioane de martori: martor tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a standardului de referință testat și concentrația aproximativă EC_{50} (agonism) sau IC_{50} (antagonism) a standardului de referință. Raportul dintre valorile medii ale eșantioanelor de martori de pe prima placă și cele cinci plăci rămase ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

17. Pentru fiecare dintre plăcile de microtitrare din cadrul unei serii de teste, se calculează factorul z (10). Factorul z ar trebui să fie calculat utilizând răspunsurile la concentrația cea mai mare și cea mai mică a standardului de referință. O placă de microtitrare este considerată valabilă în cazul în care îndeplinește cerințele menționate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

18. Standardul de referință ar trebui să demonstreze o curbă doză-răspuns sigmoidală. Valoarea EC_{50} sau IC_{50} derivată din răspunsul seriei de diluții a standardului de referință ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

19. Fiecare serie de teste ar trebui să conțină un eșantion de martor pozitiv și un eșantion de martor negativ. Inducția relativă calculată a eșantionului de martor pozitiv și a celui de martor negativ ar trebui să îndeplinească cerințele indicate în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

20. În timpul tuturor măsurătorilor, factorul de inducție al celei mai mari concentrații a standardului de referință ar trebui să fie măsurat prin împărțirea mediei celor mai mari valori ale răspunsului ca unitate de lumină relativă (RLU) al standardului de referință 17β-estradiol la media valorilor răspunsului RLU al martorului tratat cu solvent de referință. Acest factor de inducție ar trebui să îndeplinească cerințele minime pentru inducția multiplicată, astfel cum este indicat în tabelul 3C (agonism) sau în tabelul 4C (antagonism).

21. Numai plăcile de microtitrare care îndeplinesc toate criteriile de acceptare menționate mai sus sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat.

22. Criteriile de acceptare sunt aplicabile atât pentru testele de depistare prealabilă, cât și pentru cele complexe.

▼M8

Tabelul 1

Concentrațiile standardului de referință, ale martorului pozitiv (MP) și ale martorului negativ (MN) pentru bioanaliza agonistă CALUX

	Substanță	NR. CAS	Interval de testare (M)
Standard de referință	17β-estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Martor pozitiv (MP)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Martor negativ (MN)	corticosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabelul 2

Concentrațiile standardului de referință, ale martorului pozitiv (MP) și ale martorului negativ (MN) pentru bioanaliza antagonistă CALUX

	Substanță	**NR. CAS**	**Interval de testare (M)**
Standard de referință	tamoxifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Martor pozitiv (MP)	4-hidroxi-tamoxifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Martor negativ (MN)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabelul 3

Criterii de acceptare pentru bioanaliza agonistă ERα CALUX

A - eșantioane individuale pe o placă		**Criterii**
1	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori (pentru MP, MN, fiecare diluție a substanței chimice de testat și a standardului de referință, cu excepția C0)	< 15 %
2	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru standardul de referință și martorii tratați cu solvent ai substanțelor chimice de testat (C0, SC)]	< 30 %
3	Scăpare LDH maximă, ca măsură a citotoxicității.	< 120 %
B - în cadrul unei singure plăci de microtitrare		
4	Raportul dintre martorul standard de referință tratat cu solvent (C0; placa 1) și martorul tratat cu solvent al substanței chimice de testat (SC; plăci 2-x)	0,5-2,0
5	Rata concentrației aproximative EC50 și a celei mai mari concentrații standard de referință pe placa 1 și a concentrației aproximative EC50 și a celei mai mari concentrații standard de referință pe plăcile 2-x (C4, C8)	0,70-1,30
6	Factorul Z pentru fiecare placă	> 0,6
C - în cadrul unei singure serii de analize (toate plăcile în cadrul unei serii)		
7	Curba sigmoidală a standardului de referință	Da (17ß-estradiol)
8	Standardul de referință pentru intervalul EC50 17ß-estradiol	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Inducția multiplicată minimă a celei mai mari concentrații de 17ß-estradiol, în ceea ce privește martorul tratat cu solvent standard de referință.	5
10	Inducție relativă (%) MP.	> 30 %
11	Inducție relativă (%) MN	< 10 %

▼M8

Aprox.: aproximativ; MP: martor pozitiv; MN: martor negativ; SC: martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat; C0: martor standard de referință tratat cu solvent; SD: abatere standard; LDH: lactat dehidrogenază

Tabelul 4

Criterii de acceptare pentru bioanaliza antagonistă ERα CALUX

A - eșantioane individuale pe o placă		**Criterii**
1	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru MN, MP, fiecare diluție a substanței chimice de testat și a standardului de referință, a martorului tratat cu solvent (C0)]	< 15 %
2	Maxim % SD din godeurile replicate de trei ori [pentru martorul tratat cu vehicul (VC) și cea mai mare concentrație standard de referință (C8)]	< 30 %
3	Scăpare LDH maximă, ca măsură a citotoxicității.	< 120 %
B - în cadrul unei singure plăci de microtitrare		
4	Raportul dintre martorul standard de referință tratat cu solvent (C0; placa 1) și martorul tratat cu solvent al substanței chimice de testat (SC; plăci 2-x)	0,70-1,30
5	Rata concentrațiilor aproximative standard de referință IC50 pe placa 1 și a concentrațiilor aproximative standard de referință IC50 pe plăcile 2-x (C4)	0,70-1,30
6	Raportul dintre cele mai mari concentrații standard de referință de pe placa 1 și cele mai mari concentrații standard de referință de pe plăcile 2-x (C8)	0,50-2,0
7	Factorul Z pentru fiecare placă	> 0,6
C - în cadrul unei singure serii de analize (toate plăcile în cadrul unei serii)		
8	Curba sigmoidală a standardului de referință	Da (tamoxifen)
9	Standardul de referință pentru intervalul IC50 (tamoxifen)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Inducția minimă multiplicată a martorului tratat cu solvent standard de referință față de cea mai mare concentrație a tamoxifenului.	2,5
11	Inducție relativă (%) MP.	< 70 %
12	Inducție relativă (%) MN	> 85 %

Aprox.: aproximativ; MP: martor pozitiv; MN: martor negativ; VC: martorul tratat cu vehicul (martorul tratat cu solvent fără concentrație fixă a standardului de referință agonist); SC: martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat; C0: martor standard de referință tratat cu solvent; SD: abatere standard; LDH: lactat dehidrogenază

Martor tratat cu solvent/vehicul, standarde de referință, martori pozitivi, martori negativi

23. Pentru testul de depistare prealabilă și pentru testele complexe ar trebui să se utilizeze același martor tratat cu solvent/vehicul, aceleași standarde de referință și aceiași martori pozitivi și martori negativi. În plus, concentrația standardelor de referință, a martorilor pozitivi și a martorilor negativi ar trebui să fie aceeași.

▼M8

Martorul tratat cu solvent

24. Solventul utilizat pentru a dizolva substanțele chimice de testat ar trebui să fie testat ca martor tratat cu solvent. Dimetilsulfoxidul [DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5] a fost utilizat ca vehicul în timpul validării bioanalizei ERα CALUX. Dacă se utilizează un alt solvent decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul. Este de remarcat faptul că martorul tratat cu solvent pentru studiile antagoniste conține o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol (aproximativ concentrația EC_{50}). Pentru a testa solventul utilizat pentru studii antagoniste, ar trebui să se prepare și să se testeze un martor tratat cu vehicul.

Martor tratat cu vehicul (antagonism)

25. Pentru testarea antagonismului, mediul de analiză este suplimentat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol (aproximativ concentrația EC_{50}). Pentru a testa solventul utilizat pentru a dizolva substanțele chimice de testat pentru antagonism, ar trebui preparat un mediu de analiză fără o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol. Acest eșantion de martor este indicat ca fiind martorul tratat cu vehicul. Dimetilsulfoxidul [DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5] a fost utilizat ca vehicul în timpul validării bioanalizei ERα CALUX. Dacă se utilizează un alt solvent decât DMSO, toate standardele de referință, martorii și substanțele chimice de testat ar trebui să fie testați în același vehicul.

Standarde de referință

26. Standardul de referință agonist este 17β-estradiol (tabelul 1). Standardele de referință cuprind o serie de diluții de opt concentrații de 17β-estradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Standardul de referință antagonist este tamoxifenul (tabelul 2). Standardele de referință cuprind o serie de diluții de opt concentrații de tamoxifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Fiecare dintre concentrațiile standardului de referință antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Martor pozitiv

28. Martorul pozitiv pentru studii agoniste este 17α-metiltestosteron (tabelul 1).

29. Martorul pozitiv pentru studii antagoniste este 4-hidroxitamoxifen (tabelul 2). Martorul pozitiv antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Martor negativ

30. Martorul negativ pentru studii agoniste este corticosteronul (tabelul 1).

31. Martorul negativ pentru studii antagoniste este resveratrolul (tabelul 2). Martorul negativ antagonist este coincubat cu o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Demonstrarea performanțelor laboratorului (a se vedea punctul 14 și tabelele 3 și 4 de la secțiunea „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA” din prezenta metodă de testare)

Vehicul

32. Solventul utilizat pentru dizolvarea substanței chimice de testat ar trebui să solubilizeze complet substanța chimică de testat și să fie miscibil cu mediul celular. DMSO, apa și etanolul (puritate de 95 %-100 %) sunt solvenți adecvați. În cazul în care se folosește DMSO ca solvent, concentrația maximă de DMSO în timpul incubației nu ar trebui să depășească 1 % (v/v). Înainte de utilizare, solventul ar trebui să fie testat pentru absența citotoxicității și interferența cu analizele de performanță.

Pregătirea standardelor de referință, a martorilor pozitivi, a martorilor negative și a substanțelor chimice de testat

33. Standardele de referință, martorii pozitivi, martorii negativi și substanțele chimice de testat se dizolvă în DMSO 100 % (sau un solvent adecvat). Apoi ar trebui să se prepare diluții (în serie) adecvate în același solvent. Înainte de a fi dizolvate, toate substanțele ar trebui să fie lăsate să se echilibreze la temperatura camerei. Soluțiile mamă proaspăt preparate ale standardelor de referință, ale martorilor pozitivi, ale martorilor negativi și ale substanțelor chimice de testat nu ar trebui să prezinte precipitat sau tulburare vizibilă. Stocurile de standarde de referință și de martori pot fi preparate în cantitate mare. Soluțiile mamă ale substanțelor chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate înainte de fiecare experiment. Diluțiile finale ale standardelor de referință, martorii pozitivi, martorii negativi și substanțele chimice de testat ar trebui să fie proaspăt preparate pentru fiecare experiment și utilizate în termen de 24 de ore de la preparare.

Solubilitate, citotoxicitate și stabilirea intervalului

34. În timpul testului de depistare prealabilă, se stabilește solubilitatea substanțelor chimice de testat în solventul ales. Se prepară o concentrație maximă a stocului de 0,1 M. În cazul în care această concentrație indică probleme de solubilitate, ar trebui să fie preparate soluții mamă cu concentrații mai mici până la solubilizarea completă a substanței chimice de testat. În timpul testului de depistare prealabilă, se testează diluții de 1: 10 în serie ale substanței chimice de testat. Concentrația maximă de testare pentru testarea agonistă sau antagonistă este de 1 mM. În urma testului de depistare prealabilă, se obține un interval al concentrațiilor ajustat corespunzător pentru substanțele chimice de testat care ar trebui să fie testate în cadrul testelor complexe. Diluțiile utilizate pentru testul complex ar trebui să fie de 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x și 3000x.

35. Testarea citotoxicității este inclusă în protocolul de testare agonistă și antagonistă (11). Testarea citotoxicității este inclusă atât în testul de depistare prealabilă, cât și în testele complexe. Metoda utilizată pentru a evalua citotoxicitatea în timpul validării bioanalizei ERα CALUX a fost testul de scăpare a lactatului dehidrogenază (LDH) în combinație cu inspecția vizuală calitativă a celulelor (a se vedea apendicele 4.1) în urmare expunerii la substanțele chimice de testat. Însă pot fi utilizate alte metode cantitative pentru determinarea citotoxicității [de exemplu, analiza colorimetrică (MTT) bazată pe tetrazolif (MTT) sau bioanaliza citotoxicității CALUX]. În general, concentrațiile substanțelor chimice de testat care indică o reducere mai mare de 20 % a viabilității celulare sunt considerate citotoxice și, prin urmare, nu pot fi utilizate pentru evaluarea datelor. În ceea ce privește analiza scăpărilor de LDH, concentrația substanței chimice de testat este considerată citotoxică atunci când procentul de scăpare a LDH este mai mare de 120 %.

▼**M8**

Expunerea la substanța chimică de testat și organizarea plăcilor pentru testare

36. În urma tripsinizării unui balon confluent cu celule cultivate, celulele se suspendă din nou la $1x10^5$ celule/ml în mediu de analiză fără estrogen. În godeurile interioare de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri se introduc o sută de µl de celule re-suspendate. Godeurile exterioare sunt umplute cu 200 µl de soluție salină tamponată de fosfat (PBS) (a se vedea figurile 1 și 2). Celulele introduse sunt incubate în prealabil, timp de 24 de ore, într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37°C, umiditate de 100 %).

37. După pre-incubare, plăcile sunt inspectate pentru citotoxicitate vizuală (a se vedea apendicele 4.1), contaminare și confluență. Sunt utiliate pentru testare doar plăcile care nu prezintă vizual citotoxicitate sau contaminare și au o confluență de cel puțin 85 %. Mediul din godeurile interioare se îndepărtează cu grijă și se înlocuiește cu 200 µl de mediu de testare fără estrogen conținând serii de diluții adecvate de standarde de referință, substanțe chimice de testat, martori pozitivi, martori negativi și martori tratați cu solvent (tabelul 5: studii agoniste; Tabelul 6: studii antagoniste). Toate standardele de referință, substanțele chimice de testat, martorii pozitivi, martorii negativi și martorii tratați cu solvent sunt testați în trei replici. Figura 1 prezintă distribuția pe placă pentru testarea agonistă. Figura 2 prezintă distribuția pe placă pentru testarea antagonistă. Distribuția pe placă pentru testul de depistare prealabilă și testul complex este identică. Pentru testul antagonist, toate godeurile interioare, cu excepția godeurilor cu martor tratat cu vehicul (VC) conțin, de asemenea, o concentrație fixă de standard de referință agonist 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M). Este de remarcat faptul că standardele de referință C8 și C4 ar trebui să fie adăugate pe fiecare placă cu TC.

38. După expunerea celulelor la toate substanțele chimice, plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri ar trebui să fie incubate timp de încă 24 de ore într-un incubator cu CO_2 (5 % CO_2, 37°C, umiditate de 100 %).

Figura 1

Configurația plăcii de microtitrare cu 96 de godeuri pentru depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	MP	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	MN	
H												

Plăci ulterioare

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = solvent standard de referință

C(1-8) = serii de diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale standardului de referință.

▼**M8**

MP = martor pozitiv.

MN = martor negativ.

TCx-(1-8) = diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale substanței chimice de testat pentru testul de depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist al substanței chimice de testat x.

SC = martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat (în mod optim, același solvent ca și în C0, dar, posibil, din alt lot).

Celule de culoare gri: = Godeuri exterioare, umplute cu 200 µl de PBS.

Figura 2

Configurația plăcii de microtitrare cu 96 de godeuri pentru depistarea prealabilă antagonistă și evaluarea efectului antagonist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
F		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
G		MN	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	MP	
H												

Plăci ulterioare

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = solvent standard de referință

C(1-8) = serii de diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale standardului de referință.

MN = martor negativ.

MP = martor pozitiv.

TCx-(1-8) = diluții (1-8, concentrații în ordine crescătoare) ale substanței chimice de testat pentru testul de depistare prealabilă și evaluarea efectului agonist al substanței chimice de testat x.

SC = martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat (în mod optim, același solvent ca și în C0, dar, posibil, din alt lot).

VC = martor tratat cu vehicul (martorul tratat cu solvent fără concentrație fixă a standardului de referință agonist).

Celule de culoare gri: = Godeuri exterioare, umplute cu 200 µl de PBS.

Notă: toate godeurile interioare, cu excepția godeurilor cu martor tratat cu vehicul (VC) conțin, de asemenea, o concentrație fixă de standard de referință agonist 17β-estradiol (3,0*10-12 M)

Măsurarea luminiscenței

39. Măsurarea luminiscenței este descrisă în detaliu în protocolul privind analiza agonistă și antagonistă (10). Mediul din godeuri ar trebui să fie eliminat, iar celulele ar trebui să fie lizate după 24 de ore de incubare pentru a deschide membrana celulară și a permite măsurarea activității luciferazei.

▼M8

40. Pentru măsurarea luminiscenței, această procedură necesită un luminometru prevăzut cu două injectoare. Reacția luciferazei se pornește prin injectarea substratului luciferină. Reacția se oprește prin adăugarea a 0,2 M NaOH. Reacția este oprită pentru a împiedica transmiterea luminescenței de la un godeu la altul.

41. Lumina emisă din fiecare godeu este exprimată în unități relative de lumină (RLU) pentru fiecare godeu.

Testul de depistare prealabilă

42. Rezultatele analizei de depistare prealabilă sunt utilizate pentru a determina un interval de concentrații a substanțelor chimice de testat ajustat pentru testarea complexă. Evaluarea rezultatelor analizei de depistare prealabilă și determinarea intervalului de concentrații de substanțe chimice de testat ajustat pentru testul complex sunt descrise în detaliu în protocolul privind analiza agonistă și antagonistă (10). Aici se prezintă un scurt rezumat al procedurilor de determinare a intervalului de concentrații al substanțelor chimice de testat pentru testele agoniste și antagoniste. A se vedea tabelele 5 și 6 pentru îndrumări privind conceperea diluției în serie.

Selecția concentrațiilor pentru evaluarea efectelor agoniste

43. În timpul testului de depistare prealabilă, substanțele chimice de testat ar trebui să fie testate utilizând seriile de diluții indicate în tabelele 5 (agonism) și 6 (antagonism). Toate concentrațiile ar trebui să fie testate în trei godeuri replicate de trei ori conform configurației plăcii indicate în figura 1 (agonism) sau 2 (antagonism).

44. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelul 3) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

45. Ar trebui să se ajusteze intervalele inițiale ale concentrațiilor substanțelor chimice de testat, iar testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat dacă:

— se observă citotoxicitatea. Procedura de depistare prealabilă ar trebui să fie repetată folosind concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat mai scăzute.

— testul de depistare prealabilă asupra substanței chimice de testat nu prezintă o curbă doză-răspuns completă, deoarece concentrațiile testate generează o inducție maximă. Testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat folosind concentrații ale substanței chimice de testat mai scăzute.

46. Atunci când se observă un răspuns valabil privind doza, ar trebui să se selecteze concentrația (cea mai scăzută) la care se observă o inducție maximă și care nu prezintă citotoxicitate. Cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat în cadrul testelor complexe ar trebui să fie de trei ori această concentrație selectată.

47. Ar trebui să se prepare o serie completă de diluții ajustate ale substanței chimice de testat cu respectarea etapelor de diluție indicate în tabelul 5, începând cu cea mai mare concentrație, astfel cum este stabilită mai sus.

▼M8

48. O substanță chimică de testat care nu prezintă un efect agonist ar trebui testată în cadrul testelor complexe începând cu cea mai mare concentrație necitotoxică identificată în timpul testului de depistare prealabilă.

Selecția concentrațiilor pentru evaluarea efectelor antagoniste

49. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelul 4) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

50. Ar trebui să se ajusteze intervalele inițiale ale concentrațiilor substanțelor chimice de testat, iar testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat dacă:

— se observă citotoxicitatea. Procedura de depistare prealabilă ar trebui să fie repetată folosind concentrații necitotoxice ale substanței chimice de testat mai scăzute.

— testul de depistare prealabilă asupra substanței chimice de testat nu prezintă o curbă doză-răspuns completă, deoarece concentrațiile testate generează o inhibiție maximă. Testul de depistare prealabilă ar trebui să fie repetat folosind concentrații ale substanței chimice de testat mai scăzute.

51. Atunci când se identifică un răspuns valabil privind doza, ar trebui să se selecteze concentrația (cea mai scăzută) la care se observă o inhibiție maximă și care nu prezintă citotoxicitate. Cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat în cadrul testelor complexe ar trebui să fie de trei ori această concentrație selectată.

52. Ar trebui să se prepare o serie completă de diluții ajustate ale substanței chimice de testat cu respectarea etapelor de diluție indicate în tabelul 6, începând cu cea mai mare concentrație, astfel cum este stabilită mai sus.

53. Substanțele chimice de testat care nu prezintă efecte antagoniste ar trebui testate în cadrul testelor complexe începând cu cea mai mare concentrație necitotoxică verificată prin testul de depistare prealabilă.

Teste complexe

54. În urma selecției intervalelor de concentrații ajustate, substanțele chimice de testat ar trebui să fie testate în mod cuprinzător utilizând seriile de diluții indicate în tabelele 5 (agonism) și 6 (antagonism). Toate concentrațiile ar trebui să fie testate în trei godeuri replicate de trei ori conform configurației plăcii indicate în figura 1 (agonism) sau 2 (antagonism).

55. Numai rezultatele analizei care îndeplinesc criteriile de acceptare (tabelele 3 și 4) sunt considerate valabile și pot fi utilizate pentru a evalua răspunsul substanțelor chimice de testat. În cazul în care una sau mai multe plăci de microtitrare dintr-o serie de analize nu îndeplinesc (îndeplinește) criteriile de acceptare, respectivele microplăci ar trebui să fie analizate din nou. În cazul în care prima placă care conține seriile complete de diluții ale standardului de referință nu respectă criteriile de acceptare, întreaga serie de teste (6 plăci) trebuie să fie analizate din nou.

▼**M8**

Tabelul 5

Concentrația și diluțiile standardelor de referință, ale martorilor și substanțelor chimice de testat utilizate pentru testul agonist

17β-estradiol de referință		TCx - testul de depistare prealabilă		TCx - testul complex		Martori	
conc. (M)		diluție		diluție		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3000 x	MP	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1000 x	MN	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - substanța chimică de testat x
MP - martor pozitiv (17α-metiltestosteron)
MN - martor negativ (corticosteron)
C0 - martor standard de referință tratat cu solvent
SC - martor tratat cu solvent al substanței chimice de testat

▼**M8**

Tabelul 6

Concentrația și diluțiile standardelor de referință, ale martorilor și substanțelor chimice de testat utilizate pentru testul antagonist

Tamoxifen de referință		TCx - testul de depistare prealabilă		TCx - testul complex		Martori	
conc. (M)		diluție		diluție		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3.000 x	MP	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1.000 x	MN	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Agonist suplimentat**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**conc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - substanța chimică de testat x

MP - martor pozitiv (4-hidroxitamoxifen)

MN - martor negativ (resveratrol)

C0 - martor standard de referință tratat cu solvent

SC - martor tratat cu solvent al substanței chimice de testatVC - martor tratat cu vehicul (nu conține o concentrație fixă a standardului de referință agonist 17β-estradiol ($3,0*10^{-12}$ M)

▼M8

Colectarea datelor și analiza datelor

56. În urma testului de depistare prealabilă și a testului complex, ar trebui să se determine valorile EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} și inducția maximă (TCx_{max}) ale unei substanțe chimice de testat pentru testarea agonistă. Pentru testarea antagonistă, ar trebui să se calculeze valorile IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} și inducția minimă (TCx_{min}). Figura 3 (agonism) și 4 (antagonism) cuprinde o reprezentare grafică a acestor parametri. Parametrii necesari se calculează pe baza inducției relative a fiecărei substanțe chimice de testat [în raport cu inducția maximă a standardului de referință (= 100 %)]. Regresia neliniară (panta variabilă, 4 parametri) ar trebui să fie utilizată pentru evaluarea datelor conform următoarei ecuații:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

Unde:

X = Log al dozei sau concentrației

Y = Răspuns [inducție relativă (%)]

Partea superioară = Inducție maximă (%)

Partea inferioară = Inducție minimă (%)

$LogEC_{50}$ = Valoare log a concentrației la care se observă 50 % din răspunsul maxim

HillSlope = Factorul de pantă sau panta Hill

57. Datele brute obținute de la luminometru, exprimate ca unități relative de lumină (RLU), ar trebui să fie transferate în fișa de analiză a datelor concepută pentru teste de depistare prealabilă și teste complexe. Datele brute ar trebui să respecte criteriile de acceptare indicate în tabelele 3A și 3B (agonism) sau 4A și 4B (și antagonism). În cazul în care datele brute respectă criteriile de acceptare, se parcurg următoarele etape de calcul pentru determinarea parametrilor necesari:

Agonism

— Se scade media RLU a martorului tratat cu solvent al standardelor de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale standardelor de referință.

— Se scade media RLU a martorului tratat cu solvent al substanței chimice de testat din fiecare dintre datele de analiză brute ale substanțelor chimice de testat.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a standardului de referință. Se setează inducția celei mai mari concentrații a standardului de referință la 100 %.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a substanței chimice de testat în comparație cu cea mai mare concentrație a standardului de referință de 100 %.

— Se evaluează rezultatele analizei în urma regresiei neliniare (pantă variabilă, 4 parametri).

▼**M8**

— Se determină valorile EC_{50} și EC_{10} ale standardului de referință.

— Se determină valorile EC_{50} și EC_{10} ale substanțelor chimice de testat.

— Se determină inducția relativă maximă a substanței chimice de testat (TC_{max}).

— Se determină valorile PC_{10} și PC_{50} ale substanțelor chimice de testat.

Pentru substanțele chimice de testat, este posibil să nu se obțină întotdeauna o curbă doză-răspuns completă, de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate. Prin urmare, nu se pot determina valorile EC_{50}, EC_{10} și PC_{50}. Într-un astfel de caz, se pot determina doar valorile PC_{10} și TC_{max}.

Antagonism

— Se scade media RLU a celei mai mari concentrații standard de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale standardelor de referință.

— Se scade media RLU a celei mai mari concentrații standard de referință din fiecare dintre datele de analiză brute ale substanțelor chimice de testat.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a standardului de referință. Se setează inducția celei mai mici concentrații a standardului de referință la 100 %.

— Se calculează inducția relativă a fiecărei concentrații a substanței chimice de testat în comparație cu cea mai scăzută concentrație a standardului de referință de 100 %.

— Se evaluează rezultatele analizei în urma regresiei neliniare (pantă variabilă, 4 parametri).

— Se determină valorile IC_{50} și IC_{20} ale standardului de referință.

— Se determină valorile IC_{50} și IC_{20} ale substanțelor chimice de testat.

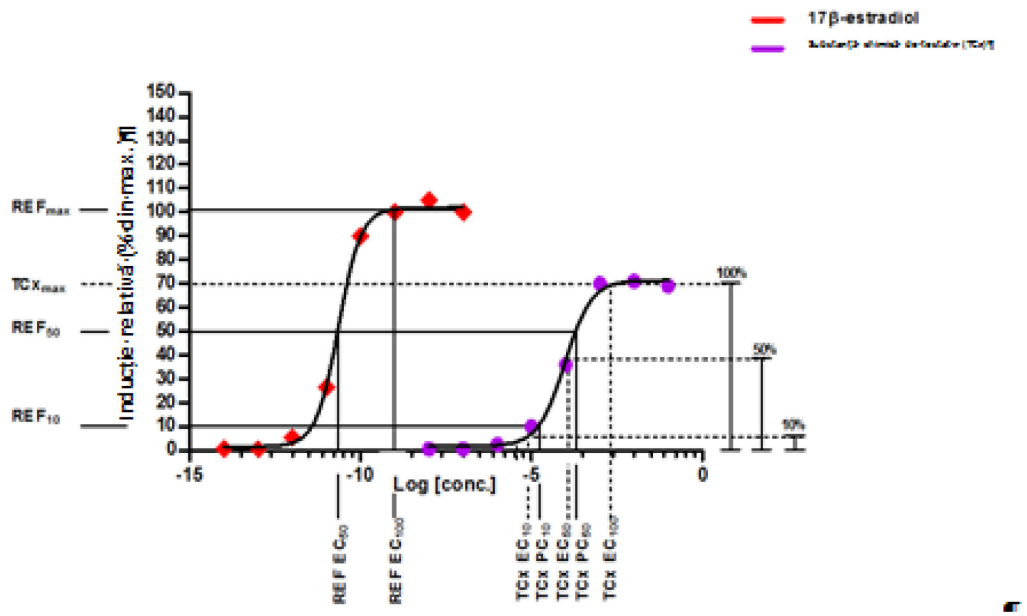
— Se determină inducția relativă minimă a substanței chimice de testat (TC_{min}).

— Se determină valorile PC_{80} și PC_{50} ale substanțelor chimice de testat.

▼M8

Figura 3

Prezentarea parametrilor determinați în analiza agonistă



EC_{10} = concentrația unei substanțe la care se observă 10 % din răspunsul maxim al acesteia

EC_{50} = concentrația unei substanțe la care se observă 50 % din răspunsul maxim al acesteia

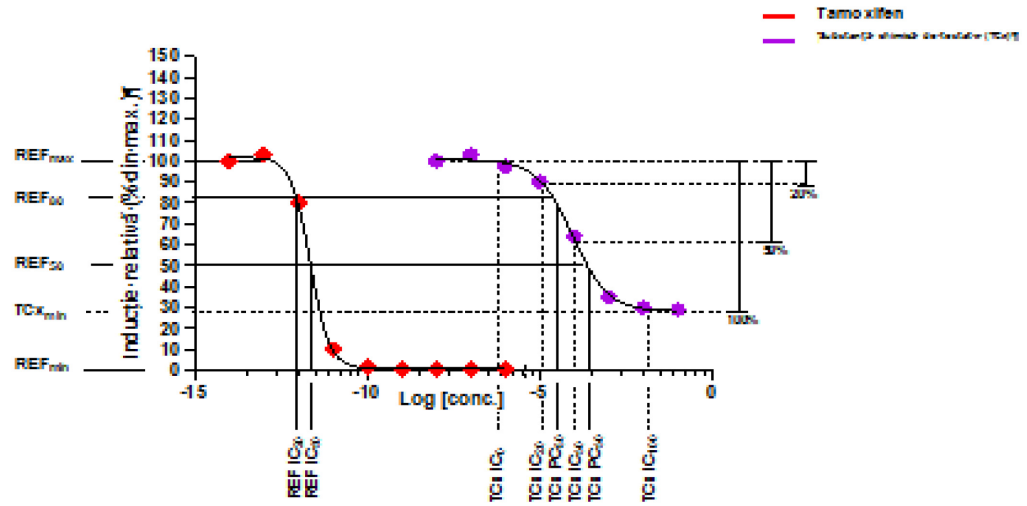
PC_{10} = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea EC_{10} a standardului de referință.

PC_{50} = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea EC_{50} a standardului de referință.

TCx_{max} = inducția relativă maximă a substanței chimice de testat.

Figura 4

Prezentarea parametrilor determinați în analiza antagonistă



IC20 = concentrația unei substanțe la care se observă 80 % din răspunsul maxim al acesteia (inhibiție de 20 %).

▼M8

IC50 = concentrația unei substanțe la care se observă 50 % din răspunsul maxim al acesteia (inhibiție de 50 %).

PC80 = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea IC20 a standardului de referință.

PC50 = concentrația unei substanțe chimice de testat la care răspunsul acesteia este egal cu valoarea IC50 a standardului de referință.

TCxmin = inducția relativă minimă a substanței chimice de testat.

Pentru substanțele chimice de testat, este posibil să nu se obțină întotdeauna o curbă doză-răspuns completă, de exemplu, din cauza unor probleme de citotoxicitate sau de solubilitate. Prin urmare, nu se pot determina valorile IC_{50}, IC_{20} și PC_{50}. Într-un astfel de caz, se pot determina doar valorile PC_{20} și TC_{min}.

58. Rezultatele ar trebui să fie bazate pe două (sau trei) testări independente. Dacă două testări generează rezultate comparabile și, prin urmare, reproductibile, nu este necesar să se efectueze o a treia testare. Pentru ca rezultatele să fie acceptabile, acestea ar trebui:

— să îndeplinească criteriile de acceptabilitate (a se vedea Criteriile de acceptabilitate de la punctele 14-22),

— să fie reproductibile.

Criterii de interpretare a datelor

59. Pentru interpretarea datelor și stabilirea deciziei dacă o substanță chimică de testat este considerată pozitivă sau negativă, se utilizează următoarele criterii:

Agonism

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **pozitivă** în cazul în care:

1 Valoarea TC_{max} este egală cu sau mai mare decât 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF_{10}).

2 Cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau depășesc valoarea REF_{10}.

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **negativă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmax nu depășește rata de 10 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF10).

2 Mai puțin de două concentrații ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau depășesc valoarea REF10.

Antagonism

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **pozitivă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmin este egală cu sau mai mică decât 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF80 = inhibiție de 20 %).

2 Cel puțin două concentrații consecutive ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau mai mici decât valoarea REF80.

▼**M8**

Pentru fiecare test complex, o substanță chimică de testat este considerată **negativă** în cazul în care:

1 Valoarea TCmin depășește 80 % din răspunsul maxim al standardului de referință (REF80 = inhibiție de 20 %).

2 Mai puțin de două concentrații ale substanței chimice de testat sunt egale cu sau mai mici decât valoarea REF80.

60. Pentru a caracteriza puterea răspunsului pozitiv al unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se consemneze magnitudinea efectului (agonism: TC_{max}; antagonism: TC_{min}) și concentrația la care se produce efectul (agonism: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonism: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

RAPORTUL TESTULUI

61. A se vedea punctul 20 din „COMPONENTELE ANALIZEI ER TA”

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT și van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J și Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V și Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B și Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG și van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173-187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M și Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY și Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I și Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Țările de Jos.

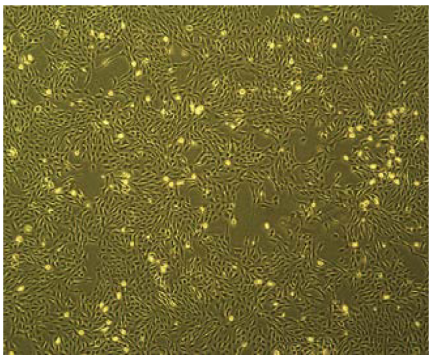
▼**M8**

Apendicele 4.1:

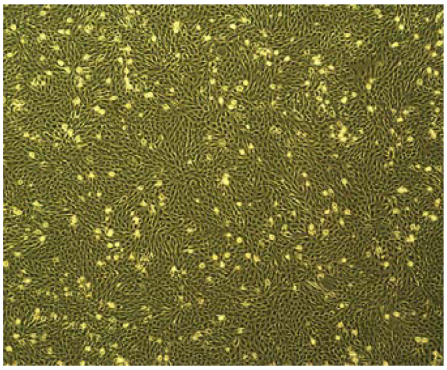
INSPECȚIA VIZUALĂ A VIABILITĂȚII CELULARE



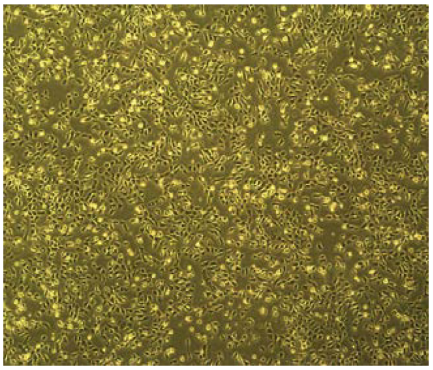
Confluență de < 5 %. Celulele tocmai au fost însămânțate. Viabilitate celulară de 100 %. Clasificare: „fără citotoxicitate”



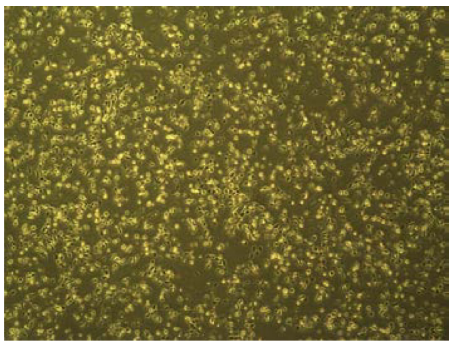
Confluență de > 85 %. În această etapă, celulele sunt expuse la substanțe chimice de testat. Viabilitate celulară de > 95 %.
Clasificare: „fără citotoxicitate”



Confluență de > 95 %. Celulele sunt grupate strâns și încep să crească în exces. Viabilitate celulară de > 95 %.
Clasificare: „fără citotoxicitate”



Viabilitate celulară de < 25 %. Celulele se detașează și legătura dintre acestea slăbește. Celulele se rotunjesc. Clasificare: „citotoxicitate”



Viabilitate celulară de < 5 %. Celulele se detașează complet și legătura dintre acestea se rupe. Celulele se rotunjesc. Clasificare: „citotoxicitate”

▼M8

B.67. TESTE *IN VITRO* DE MUTAȚII GENICE PE CELULE DE MAMIFERE FOLOSIND GENA TIMIDIN-KINAZĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE nr. 490 privind testarea (2016). Metodele de testare sunt revizuite periodic și modificate în contextul progreselor științifice, al necesităților de reglementare și al bunăstării animalelor. Analiza pe limfom de șoarece (MLA) și testul TK6 care utilizează locus de timidin-kinază (TK) au fost incluse inițial în metoda de testare B.17. Ulterior, Grupul de lucru al experților MLA din cadrul Atelierului internațional pentru testarea genotoxicității (International Workshop for Genotoxicity Testing - IWGT) a elaborat recomandări armonizate la nivel internațional privind criteriile de acceptare a analizei și interpretarea datelor pentru MLA (1) (2) (3) (4) (5), iar aceste recomandări sunt integrate în această nouă metodă de testare B.67. Această metodă de testare este dezvoltată pentru MLA și, deoarece utilizează, de asemenea, locusul TK, pentru testul TK6. Deși MLA a fost utilizată pe scară largă în scopuri de reglementare, TK6 a fost utilizat mult mai puțin frecvent. Ar trebui remarcat faptul că, în ciuda similitudinii dintre punctele finale, cele două linii celulare nu sunt interschimbabile, iar programele de reglementare pot să își exprime în mod valabil preferința pentru una față de cealaltă pentru un anumit scop de reglementare. De exemplu, validarea MLA demonstrează caracterul adecvat al acesteia pentru detectarea nu doar a mutației genice, ci și a capacității unei substanțe chimice de testat de a induce daune cromozomiale structurale. Această metodă de testare face parte dintr-o serie de metode de testare cu privire la toxicologia genetică. OCDE a elaborat un document care oferă informații succinte privind testarea pentru toxicologia genetică și o prezentare a modificărilor efectuate recent asupra orientărilor OCDE privind testarea pentru toxicologia genetică (6).

2. Scopul testelor *in vitro* de mutații genice pe celule de mamifere este detectarea mutațiilor genice induse de substanțe chimice. Liniile celulare utilizate în aceste teste măsoară mutațiile directe ale genelor reporter, în special a genei endogene timidin-kinază (*TK* pentru celule umane și *Tk* pentru celule de rozătoare, denumite în continuare, în mod colectiv, *TK* în prezenta metodă de testare). Această metodă de testare este prevăzută a fi utilizată pe două linii celulare: linia celulară L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C de limfom la șoarece (denumită, în general, L5178Y) și linia celulară umană limfoblastoidă TK6 (denumită, în general, TK6). Deși cele două linii celulare diferă din cauza originii lor, a creșterii celulelor, a statutului p53 etc., testele privind mutațiile genice *TK* pot fi desfășurate într-un mod similar pe ambele tipuri de celule, astfel cum se descrie în prezenta metodă de testare.

3. Natura autosomală și heterozigotă a genei timidin-kinază permite detectarea de colonii viabile ale căror celule sunt deficitare în enzima timidin-kinază ca urmare a mutației de la $TK^{+/-}$ la $TK^{-/-}$. Această deficiență poate să apară ca urmare a unor evenimente genetice care afectează gena *TK*, incluzând atât mutații genice (mutații punctiforme, mutații care alterează cadrul de citire, mici deleții etc.), cât și evenimente cromozomiale (deleții semnificative, rearanjări ale cromozomilor și recombinarea mitotică). Aceste din urmă evenimente sunt exprimate ca fiind o pierdere de heterozigozitate, care reprezintă o modificare genetică răspândită a genelor de suprimare a tumorilor în tumorigeneza la om. Teoretic, pierderea întregului cromozom care poartă gena *TK* ca urmare a deteriorării fusului și/sau a non-disjuncției mitotice poate fi detectată în MLA. Într-adevăr, o combinație de analiză citogenetică și moleculară arată în mod clar că anumite gene mutante TK MLA reprezintă rezultatul non-disjuncției. Însă, dovezile arată că testele privind mutațiile genetice *TK* nu pot detecta în mod fiabil aneugenii atunci când sunt aplicate criteriile standard de citotoxicitate (astfel cum este descris în prezenta metodă) și, prin urmare, nu este adecvat să se recurgă la aceste teste pentru detectarea aneugenilor (7)(8)(9).

▼**M8**

4. În cadrul testelor privind mutații ale genei *TK*, sunt generate două clase fenotipice distincte de gene mutante *TK*; genele mutante normale care cresc în același ritm ca și celulele heterozigote TK și genele mutante care cresc lent, cu perioade de dublare prelungite. Genele mutante care cresc normal și cele care cresc lent sunt recunoscute ca fiind gene mutante din colonii mari și din colonii mici în MLA și ca gene mutante din colonii care se formează timpuriu și din colonii care se formează tardiv în TK6. Natura moleculară și citogenică atât a genelor mutante din colonii mari, cât și a genelor mutante din coloniile mici, în cadrul MLA, a fost examinată în detaliu (8) (10) (11) (12) (13). Natura moleculară și citogenică atât a genelor mutante care apar timpuriu, cât și a genelor mutante care apar tardiv, în cadrul TK6, a fost supusă unei examinări ample (14) (15) (16) (17). Genele mutante care cresc lent, pentru ambele tipuri de celule, au suferit deteriorări genetice care implică o genă (gene) presupusă (presupuse) a regla creșterea în apropierea locusului *TK*, ceea ce determină perioade de dublare prelungite și formarea de colonii care apar tardiv sau mici (18). Inducția genelor mutante care cresc lent a fost asociată cu substanțe chimice care induc schimbări structurale brute la nivel de cromozomi. Celulele a căror deteriorare nu implică o genă (gene) presupusă (presupuse) a regla creșterea în apropierea locusului TK cresc într-un ritm similar celui al celulelor parentale și devin gene mutante care cresc normal. Inducerea genelor mutante care cresc normal în principal este asociată cu substanțe chimice care acționează în principal ca agenți mutageni punctuali. În consecință, este esențial să se numere atât genele mutante care cresc lent, cât și genele mutante care cresc normal pentru a recupera toate genele mutante și pentru a prezenta o imagine de ansamblu a tipului (tipurilor) de deteriorări (mutageni/clastogeni) induse de substanța chimică de testat (10) (12) (18) (19).

5. Metoda de testare este organizată astfel încât să furnizeze informații generale care se aplică atât pentru MLA, cât și pentru TK6, precum și indicații de specialitate pentru testele individuale.

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

7. Testele realizate *in vitro* necesită, în general, utilizarea unei surse exogene de activare metabolică. Sistemul exogen de activare metabolică nu reproduce integral condițiile *in vivo*.

8. Ar trebui să se acorde atenție evitării condițiilor care ar putea conduce la rezultate pozitive artificiale (și anume, o posibilă interacțiune cu sistemul de testare), care nu sunt cauzate de interacțiunea dintre substanța chimică de testat și materialul genetic al celulei; astfel de condiții includ modificări ale pH-ului sau ale osmolalității, interacțiunea cu componentele de mediu (20) (21) sau niveluri excesive ale citotoxicității (22) (23) (24). Citotoxicitatea care depășește nivelurile recomandate de citotoxicitate de vârf, astfel cum sunt definite la punctul 28, este considerată excesivă pentru testul MLA și TK6. În plus, ar trebui remarcat faptul că substanțele chimice de testat care sunt analoge timidinei sau care se comportă ca analoge timidinei pot crește frecvența genelor mutante prin creșterea selectivă a genelor mutante spontane de fond în timpul tratamentului celular și necesită metode de testare suplimentare pentru o evaluare adecvată (25).

9. În cazul nanomaterialelor fabricate, pot fi necesare adaptări specifice ale acestei metode de testare, dar care nu sunt descrise în prezenta metodă de testare.

10. Înainte de utilizarea metodei de testare pentru a testa un amestec în vederea generării de date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului.

▼M8

11. Celulele mutante care nu pot desfășura activitatea enzimei timidin-kinază din cauza unei mutații $TK^{+/-}$ în $TK^{-/-}$ sunt rezistente la efectele citostatice ale trifluridinei (TFT) analoge pirimidinei. Celulele cu performanță în *TK* sunt sensibile la TFT, ceea ce produce inhibarea metabolismului celular și întrerupe continuarea diviziunii celulare. Astfel, celulele mutante pot să prolifereze în prezența TFT și să formeze colonii vizibile, însă celulele care conțin enzima TK nu pot face acest lucru.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Celulele în suspensie sunt expuse la substanța chimică de testat cu și în absența unei surse exogene de activare metabolică (a se vedea punctul 19), pentru o perioadă adecvată de timp (a se vedea punctul 33) și apoi subcultivate pentru determinarea citotoxicității și pentru a permite manifestarea fenotipică înainte de selectarea mutantului. Citotoxicitatea este determinată prin creștere totală relativă (RTG - a se vedea punctul 25) pentru MLA și prin supraviețuire relativă (RS - a se vedea punctul 26) pentru TK6. Culturile tratate sunt menținute în mediul de creștere pentru un timp suficient, specific fiecărui tip de celulă (a se vedea punctul 37), pentru a permite o expresie fenotipică aproape optimă a mutațiilor induse. În urma manifestării fenotipice, frecvența mutanților se determină prin însămânțarea unui număr cunoscut de celule într-un mediu ce conține agentul selectiv pentru a detecta coloniile mutante și într-un mediu fără agent selectiv pentru a determina eficacitatea clonării (viabilitatea). După un timp corespunzător de incubare, se numără coloniile. Frecvența genelor mutante se calculează pe baza numărului de colonii de gene mutante, corectat prin eficacitatea clonării la momentul selecției genelor mutante.

DESCRIEREA METODEI

Pregătiri

Celule

13. Pentru MLA: Întrucât MLA a fost dezvoltată și caracterizată folosind sublinia de celule L5178Y TK ± 3.7.2C, această sublinie specifică trebuie să fie utilizată pentru MLA. Linia celulară L5178Y a fost obținută dintr-un limfom timic indus de metilcolantren de la un șoarece DBA-2 (26). Clive și colaboratorii au tratat celulele L5178Y (denumite de Clive $TK^{+/+}$ -3) cu sulfonat de etil metan și au izolat o clonă $TK^{-/-}$ (denumită $TK^{-/-}$ -3.7) folosind bromodeoxiuridină ca agent selectiv. Din clona $TK^{-/-}$ a fost izolată o clonă spontană $TK^{+/-}$ (denumită $TK^{+/-}$ -3.7.2.) și o subclonă (denumită $TK^{+/-}$-3.7.2C), care au fost caracterizate pentru a fi utilizate în MLA (27). Cariotipul pentru linia celulară a fost publicat (28) (29) (30) (31). Numărul modal de cromozomi este 40. Există un cromozom metacentric (t12;13) care ar trebui să fie considerat drept un singur cromozom. Locusul *TK* la șoarece este situat la capătul distal al cromozomului 11. Linia celulară L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C suferă mutații la nivelul ambelor alele ale p53 și produce proteina mutantă p53 (32) (33). Statutul p53 al liniei celulare $TK^{+/-}$-3.7.2C este susceptibil de a fi responsabil pentru capacitatea testului de a detecta deteriorări la scară largă (17).

14. Pentru TK6: TK6 este o linie celulară limfoblastoidă umană. Linia celulară parentală este o linie de celule transformată de virusul Epstein-Barr, WI-L2, care a fost inițial derivată de la un exemplar mascul de 5 ani cu sferocitoză ereditară. Prima clonă izolată, HH4, a fost mutagenizată cu ICR191 și a fost generată o linie celulară *TK* heterozigotă, TK6 (34). Celulele TK6 sunt aproape diploide și cariotipul reprezentantiv este 47, XY, 13 +, t(14; 20), t(3; 21) (35). Locusul *TK* la om este situat pe brațul lung al cromozomului 17. TK6 este o linie celulară cu proteină p53 competentă, deoarece prezintă o secvență de p53 de tip „wild” pe ambele alele și exprimă numai proteina p53 de tip „wild” (36).

▼M8

15. Pentru MLA și TK6, atunci când se stabilește sau se completează pentru prima dată un stoc principal, se recomandă ca laboratorul de testare să asigure absența contaminării cu *micoplasmă*, să determine cariotipul celulelor sau să vopsească cromozomii care adăpostesc locusul *TK* și să verifice perioadele de dublare a populației. Ar trebui să se stabilească durata normală a ciclului celular în cazul celulelor utilizate în laboratorul de testare, care să fie conform caracteristicilor celulare publicate (16) (19) (37). Acest stoc principal ar trebui să fie păstrat la -150° C sau la o temperatură mai mică și utilizat pentru a pregăti toate stocurile de celule de lucru.

16. Înainte de a stabili un număr mare de stocuri de lucru păstrate în condiții criogenice sau chiar înainte de a fi utilizată într-un experiment, este posibil să fie necesară curățarea culturii de celulele mutante preexistente [cu excepția cazului în care frecvența genei mutante din martorul tratat cu solvent (MF) se află deja în intervalul acceptabil - a se vedea tabelul 2 pentru MLA)]. Aceasta se realizează folosind metotrexat (aminopterină) pentru selectarea și eliminarea celulelor deficiente de TK și adăugarea de timidină, hipoxantină și glicină (L5178Y) sau 2-deoxicitidină (TK6) în cultură pentru a asigura o creștere optimă a celulelor competente TK (19) (38) (39) și (40) pentru TK6. Îndrumări generale cu privire la bune practici pentru întreținerea culturilor celulare, precum și îndrumări specifică pentru celulele L5178Y și TK6 pot fi găsite în referințele (19) (31) (37) (39) (41). Pentru laboratoarele care necesită stocuri de celule principale pentru a inița MLA sau TK6 sau pentru a obține stocuri de celule principale noi, este disponibil un depozit al celulelor care cuprinde celule bine caracterizate (37).

Condiții pentru medii și cultură

17. Pentru ambele teste ar trebui să fie asigurate condiții adecvate pentru mediul de cultură și incubare (de exemplu, vase de cultură, umiditate atmosferică de 5 % CO2, temperatură de incubare de 37 °C) pentru menținerea culturilor. Culturile de celule ar trebui să fie menținute întotdeauna în condiții care să asigure creșterea acestora în etapa de înregistrare. Este deosebit de important să se aleagă condiții de medii și de cultură astfel încât să asigure creșterea optimă a celulelor în perioada de manifestare și clonarea atât pentru celulele mutante, cât și pentru cele nemutante. Pentru MLA și TK6, este important, de asemenea, să se asigure, prin condițiile de cultură, creșterea optimă atât a genelor mutante TK din coloniile mari/care se formează timpuriu, cât și a celor din coloniile mici/care se formează tardiv. Mai multe detalii privind cultura, inclusiv cu privire la necesitatea de a inactiva la căldură în mod corespunzător serul de cal dacă se utilizează mediul RPMI în timpul selecției genelor mutante, se pot găsi în referințele (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Pregătirea culturilor

18. Celulele se propagă din culturi mamă, se însămânțează în mediul de cultură la o anumită densitate astfel încât celulele în suspensie să continue să crească exponențial pe durata tratamentului și în perioadele de manifestare.

Activare metabolică

19. Ar trebui să se utilizeze sisteme endogene de activare metabolică atunci când se utilizează celule L5178Y și TK6, deoarece acestea prezintă o capacitate metabolică endogenă inadecvată. Sistemul utilizat cel mai frecvent și care este recomandat implicit, cu excepția cazului în care se justifică altfel, constă într-o fracție postmitocondrială îmbogățită cu un cofactor (S9) preparată din ficat provenit de la rozătoare (în general, șobolani) tratat cu agenți de inducție enzimatică, de exemplu Aroclor 1254 (43) (44) (45) sau un amestec de fenobarbital și β-naftoflavonă (46) (47) (48) (49) (50) (51). Acest din urmă amestec nu este contrar Convenției de la Stockholm privind poluanții organici persistenți (52) și s-a dovedit a fi la fel de eficient ca și Aroclor 1254 pentru inducerea oxidazelor cu

▼M8

funcție mixtă (45) (46) (47) (48) (49). Fracția S9 este utilizată, în general, la concentrații pornind de la 1-2 % (v/v), dar poate fi crescută la 10 % (v/v) în mediul de testare final. Alegerea tipului și a concentrației sistemului exogen de activare metabolică sau a inductorului metabolic utilizat poate fi influențată de clasa de substanțe chimice de testat.

Prepararea substanțelor chimice de testat

20. Substanțele chimice de testat în stare solidă ar trebui să fie preparate în solvenți adecvați și diluate, dacă este cazul, înainte de tratamentul aplicat celulelor (a se vedea punctul 21). Substanțele chimice de testat în stare lichidă pot fi adăugate direct în sistemul de testare și/sau diluate anterior tratamentului sistemului de testare. Substanțele chimice de testat gazoase sau volatile ar trebui să fie testate cu modificarea adecvată a protocoalelor standard, de exemplu tratarea în de vase de cultură închise ermetic (53) (54) (55). Preparatele cu substanța chimică de testat ar trebui să fie realizate anterior tratamentului, cu excepția cazului în care există date care să demonstreze stabilitatea acestora în ceea ce privește acceptabilitatea condițiilor de stocare.

CONDIȚII DE TESTARE

Solvenți

21. Solventul ar trebui ales pentru a optimiza solubilitatea substanței chimice de testat fără a afecta negativ desfășurarea testului, de exemplu, modificarea creșterii celulare, afectarea integrității substanței chimice de testat, reacția cu vasele de cultură, afectarea sistemului de activare metabolică. Se recomandă ca, în măsura în care este posibil, să se ia în considerare în primă instanță utilizarea unui solvent apos (sau a unui mediu de cultură). Solvenții bine stabiliți sunt apa sau dimetilsulfoxidul. În general, solvenții organici nu ar trebui să depășească 1 % (v/v) și solvenții apoși (soluție salină sau apă) nu ar trebui să depășească 10 % (v/v) în mediul final de tratament. În cazul în care nu se utilizează solvenți bine stabiliți (de exemplu, etanol sau acetonă), utilizarea acestora se justifică prin date care să indice compatibilitatea acestora cu substanțele chimice de testat, cu sistemul de testare, precum și absența genotoxicității la concentrația utilizată. În lipsa unor astfel de date justificative, este important să se includă martori netratați (a se vedea apendicele 1, Definiții) pentru a demonstra că solventul ales nu induce efecte vătămătoare sau mutagene.

MĂSURAREA CITOTOXICITĂȚII ȘI ALEGEREA CONCENTRAȚIILOR DE TRATAMENT

22. În momentul determinării celei mai mari concentrații a substanței chimice de testat, ar trebui să se evite concentrațiile susceptibile de a produce răspunsuri pozitive date de artefacte, cum ar fi cele care produc citotoxicitate excesivă (a se vedea punctul 28), precipitate (a se vedea punctul 29) în mediul de cultură sau modificări importante de pH sau osmolalitate (a se vedea punctul 8). În cazul în care substanța chimică de testat provoacă o modificare importantă a pH-ului mediului la momentul adăugării acesteia, pH-ul ar putea fi ajustat prin tamponarea mediului final de tratament astfel încât să se evite rezultate pozitive date de artefacte și să se mențină condiții de cultură corespunzătoare.

23. Selecția concentrației este efectuată în funcție de citotoxicitate și pe baza altor considerente (a se vedea punctele 27-30). Chiar dacă evaluarea citotoxicității în cadrul unui test inițial poate fi utilă pentru o mai bună definire a concentrațiilor care urmează să fie utilizate în experimentul principal, efectuarea unui test inițial nu este obligatorie. Chiar dacă se realizează o evaluare inițială a citotoxicității, măsurarea citotoxicității pentru fiecare cultură este totuși necesară în cadrul experimentului principal. În cazul în care se realizează un experiment de stabilire a intervalului, acesta ar trebui să acopere o gamă largă de concentrații și poate fie să fie încheiat în ziua 1 după tratament sau continuat în ziua 2 de manifestare, până la momentul selecției genelor mutante (în cazul în care este evident caracterul adecvat al concentrațiilor).

▼**M8**

24. Citotoxicitatea ar trebui să fie determinată pentru fiecare cultură de testare și cultură martor: metodele pentru MLA (2) și TK6 (15) sunt definite prin practicile convenite la nivel internațional.

25. În cazul versiunilor cu agar-agar și micro-godeuri ale MLA: ar trebui să se evalueze citotoxicitatea folosind creșterea relativă totală (RTG), care a fost definită inițial de Clive și Spector în 1975 (2). Această măsură include creșterea relativă a suspensiei (RSG: cultură de testare/martor tratat cu solvent) în timpul tratamentului celulelor, timpul de manifestare și eficacitatea clonării relative (RCE: cultură de testare/martor tratat cu solvent) la momentul selecției genelor mutante (2). Ar trebui remarcat faptul că RSG include orice pierdere de celule care se produce în cultura de testare în timpul tratamentului (a se vedea formulele din apendicele 2).

26. Pentru TK6: Citotoxicitatea ar trebui să fie evaluată folosind indicele de supraviețuire relativă (RS), și anume, eficacitatea clonării celulelor placate imediat după tratament, ajustată pentru orice pierdere de celule în timpul tratamentului, pe baza numărului de celule, în comparație cu martorul negativ (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %) (a se vedea formula din apendicele 2).

27. Ar trebui să se evalueze cel puțin patru concentrații de testat (fără a include martorii cu solvent și cei pozitivi) care îndeplinesc criteriile de acceptabilitate (citotoxicitate adecvată, număr de celule etc.). Chiar dacă se recomandă utilizarea culturilor duplicate, se poate utiliza fie cultura duplicat, fie cultura tratată ca fiind unică în cadrul fiecărei concentrații testate. Rezultatele obținute la culturile replicate la o concentrație dată ar trebui să fie consemnate separat, însă pot fi grupate pentru analiza datelor (55). În cazul substanțelor chimice de testat cu citotoxicitate ușoară sau fără citotoxicitate, sunt adecvate, de regulă, intervale de concentrație de aproximativ 2 până la 3 ori mai mari. Dacă apare citotoxicitatea, ar trebui să se selecteze concentrații care să acopere intervalul de citotoxicitate de la valoarea care produce citotoxicitate, astfel cum este descris la punctul 28, incluzând concentrații la care gradul de citotoxicitate este moderat și redus sau zero. Multe substanțe chimice de testat prezintă curbe concentrație-răspuns cu pante abrupte, iar pentru a acoperi întreagul interval de valori de citotoxicitate sau pentru a studia în detaliu relația concentrație-răspuns, ar putea fi necesară utilizarea concentrațiilor cu spațiu de separare redus și mai mult de patru concentrații, în special în situațiile în care este necesară repetarea experimentului (a se vedea punctul 70). Utilizarea a peste patru concentrații poate fi deosebit de importantă atunci când se utilizează culturi unice.

28. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să vizeze obținerea unei valori cuprinse între 20 și 10 % RTG pentru MLA și între 20 și 10 % RS pentru TK6 (punctul 67).

29. În cazul substanțelor chimice de testat cu solubilitate redusă care nu sunt citotoxice la concentrații mai mici decât concentrația minimă de insolubilitate, cea mai mare concentrație analizată produce o turbiditate sau un precipitat vizibil cu ochiul liber sau cu ajutorul unui microscop inversat la sfârșitul tratamentului cu substanța chimică de testat. Chiar dacă apare citotoxicitate peste nivelul cel mai scăzut de concentrația de insolubilitate, se recomandă testarea doar la o singură concentrație care produce turbiditate sau cu un precipitat vizibil deoarece precipitatul ar putea genera efecte artificiale. Deoarece MLA și TK6 utilizează culturi în suspensie, ar trebui să se acorde atenție pentru a se asigura faptul că precipitatul nu interferează cu desfășurarea testului. Ar putea fi utilă, de asemenea, determinarea solubilității în mediul de cultură înainte de experiment.

▼M8

30. În cazul în care se constată inexistența precipitatului sau o citotoxicitate limitată, concentrația maximă de testare ar tregbui să corespundă cu 10 mm, 2 mg/ml sau 2 µl/ml, fiind reținută cea mai mică valoare (57) (58). În cazul în care substanța chimică de testat nu are o compoziție definită, de exemplu, o substanță cu o compoziție necunoscută sau variabilă, produse cu reacție complexă sau materiale biologice [și anume, substanțele chimice cu o compoziție necunoscută sau variabilă (UVCB)], extracte din mediu etc., este posibil să fie necesară o concentrație de vârf mai mare (de exemplu, 5 mg/ml), în absența citotoxicității suficiente, pentru a crește concentrația fiecăreia dintre componente. Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (59).

Martori

31. Pentru fiecare condiție experimentală ar trebui să se includă martori negativi testați concomitent (a se vedea punctul 21) constituiți doar dintr-un solvent în mediul de tratare și tratați în aceleași condiții precum culturile de tratare.

32. Martorii pozitivi testați în paralel sunt necesari pentru a demonstra capacitatea laboratorului de a identifica genele mutagene în condițiile prevăzute în protocolul de testare utilizat și eficacitatea sistemului exogen de activare metabolică (după caz) și a demonstra detectarea adecvată atât a genelor mutante *TK* mici/care se formează tardiv, cât și a celor mari/care se formează timpuriu. Tabelul 1 de mai jos prezintă exemple de martori pozitivi. Pot fi utilizate substanțe martor pozitive alternative, dacă acest lucru este justificat. Întrucât testele *in vitro* de genotoxicitate pe celule de mamifere sunt suficient de standardizate pentru tratamentele pe termen scurt (3-4 ore) efectuate concomitent cu și fără activare metabolică utilizând aceeași durată a tratamentului, utilizarea de martori pozitivi poate fi limitată la un mutagen care necesită activare metabolică. În acest caz, acest răspuns al unicului martor pozitiv va demonstra atât activitatea sistemului de activare metabolică, cât și capacitatea de răspuns a sistemului de testare. Dacă este utilizat, tratamentul de lungă durată (și anume, 24 de ore fără S9) necesită propriul martor pozitiv, deoarece durata tratamentului va fi diferită de testul care utilizează activarea metabolică. Fiecare martor pozitiv ar trebui să fie utilizat la una sau mai multe concentrații prevăzute a genera creșteri reproductibile și detectabile față de cele de fond pentru a demonstra sensibilitatea sistemului de testare, iar răspunsul nu ar trebui să fie compromis de citotoxicitate care depășește limitele specificate în prezenta MT (a se vedea punctul 28).

Tabelul 1

Substanțe de referință recomandate pentru evaluarea competenței de laborator și pentru selectarea de martori pozitivi

Categorie	martor	NR CAS
1. Mutageni activi fără activare metabolică		
	Metansulfonat de metil	66-27-3
	Mitomicină C	50-07-7
	4-nitrochinolină-N oxid	56-57-5
2. Mutageni care necesită activare metabolică		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ciclofosfamidă (monohidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetilbenzantracen	57-97-6
	3-metilclorantren	56-49-5

▼M8

PROCEDURA

Tratamentul cu substanța chimică de testat

33. Celulele în stadiu de proliferare se tratează cu substanța chimică de testat atât în prezența, cât și în absența unui sistem de activare metabolică. Timpul de expunere ar trebui să fie corespunzător (de obicei, un timp de 3 până la 4 ore este suficient). Cu toate acestea, ar trebui remarcat faptul că aceste cerințe pot fi diferite de cele pentru produsele farmaceutice umane (59). Pentru MLA, în cazul în care tratamentul pe termen scurt generează rezultate negative și există informații care sugerează necesitatea unui tratament prelungit [de exemplu, analogi nucleoside, substanțele chimice cu solubilitate redusă, (5) (59)], ar trebui avută în vedere efectuarea testului cu tratamentul prelungit, și anume, 24 de ore fără S9.

34. Numărul minim de celule utilizate pentru fiecare cultură de testare (martor și tratată) în fiecare etapă a testului ar trebui să depindă de frecvența genelor mutante spontane. Ca și orientare generală, se tratează și se trec celule suficiente în fiecare cultură experimentală, astfel încât să se mențină cel puțin 10, dar, în mod ideal, 100 de gene mutante spontane în toate etapele testului (tratament, expresie fenotipică și selecția genelor mutante) (56).

35. Pentru MLA, frecvența recomandată acceptabilă a genelor mutante spontane este cuprinsă între 35-140 $\times 10^{-6}$ (versiunea cu agar-agar) și 50-170 $\times 10^{-6}$ (versiunea cu micro-godeuri) (a se vedea tabelul 2). Pentru a avea cel puțin 10 și, în mod ideal, 100 de gene mutante spontane care supraviețuiesc tratamentului pentru fiecare cultură de testare, este necesar să se trateze cel puțin 6×10^6 de celule. Tratarea acestui număr de celule și menținerea unui număr suficient de celule în timpul expresiei și al clonării în scopul selectării genelor mutante asigură un număr suficient de gene mutante spontane (10 sau mai multe) în toate etapele experimentului, chiar și pentru culturile tratate la concentrații care conduc la o citotoxicitate de 90 % (astfel cum este măsurată prin RTG de 10 %) (19) (38) (39).

36. Pentru TK6, frecvența genelor mutante spontane se situează, în general, între 2 și 10×10^{-6}. Pentru a avea cel puțin 10 mutanți spontani care supraviețuiesc tratamentului pentru fiecare cultură, este necesar să se trateze cel puțin 20×10^6 de celule. Tratarea acestui număr de celule asigură un număr suficient de mutanți spontani (10 sau mai multe) chiar și pentru culturile tratate la concentrații care provoacă o citotoxicitate de 90 % în timpul tratamentului (10 % RS). În plus, în perioada de manifestare, trebuie cultivate un număr suficient de celule care să fie placate pentru selecția mutanților (60).

Timpul de expresie fenotipică și măsurarea citotoxicității și a frecvenței mutanților

37. La sfârșitul perioadei de tratament, celulele sunt cultivate pentru un anumit timp pentru a permite expresia fenotipică aproape optimă a mutanților nou induși; specific fiecărei linii celulare. În cazul MLA, perioada de expresie fenotipică este de 2 zile. În cazul TK6, perioada de expresie fenotipică este de 3-4 zile. În cazul în care se folosește un tratament de 24 h, perioada de expresie începe după încheierea tratamentului.

38. În timpul perioadei de expresie fenotipică, celulele sunt enumerate zilnic. În cazul MLA, numărul zilnic de celule este utilizat pentru a calcula creșterea zilnică a suspensiei (SG). După perioada de două zile de expresie, celulele sunt suspendate în mediu cu și fără agent selectiv pentru determinarea numărului de mutanți (plăci de selecție) și, respectiv, pentru eficacitatea clonării (plăci de viabilitate). În cazul MLA, există două metode la fel de acceptabile pentru clonarea la selecția mutantului; una care utilizează agar-agar moale și cealaltă care utilizează mediu lichid în plăci cu 96 de godeuri (19) (38) (39). Clonarea în TK6 este realizată utilizând medii lichide și plăci cu 96 de godeuri (16).

▼M8

39. Triflurotimidina (TFT) este singurul agent selectiv recomandat pentru mutanții *TK* (61).

40. Pentru MLA, plăcile cu agar-agar și plăcile cu micro-godeuri sunt numărate după 10-12 zile de incubare. În cazul TK6, coloniile din plăcile cu micro-godeuri sunt marcate după 10-14 zile pentru mutanții care se formează timpuriu. Pentru a recupera mutanții TK6 care cresc lent (se formează tardiv), celulel trebuie să fie realimentate cu mediu de creștere și TFT după numărarea mutanților timpurii și apoi să se incubează plăcile timp de încă 7-10 zile (62). A se vedea punctele 42 & 44 pentru o discuție referitoare la enumerarea mutanților TK care cresc lent și a celor care cresc normal.

41. Calculele corespunzătoare pentru cele două teste, inclusiv cele două metode (cu agar-agar și micro-godeuri) pentru MLA sunt date în apendicele 2. Pentru metoda cu agar-agar a MLA, se numără coloniile, iar numărul de colonii de mutanți este ajustat prin eficacitatea clonării pentru calcularea MF. Pentru versiunea cu micro-godeuri a MLA și a TK6, eficacitatea clonării atât în cazul plăcilor de selecție, cât și al celor de eficacitate a clonării este determinată conform distribuției Poisson (63). MF se calculează din aceste două valori ale eficacității clonării.

Caracterizarea coloniilor de mutanți

42. Pentru MLA, în cazul în care substanța chimică de testat este pozitivă (a se vedea punctele 62-63), coloniile ar trebui să fie caracterizate în funcție de dimensiunea sau creșterea acestora la cel puțin una dintre culturile de testare (în general, cea mai mare concentrație pozitivă acceptabilă) și la martorii negativi și pozitivi. În cazul în care substanța chimică de testat este negativă (a se vedea punctul 64), caracterizarea coloniilor de mutanți ar trebui să fie efectuată la martorii negativi și pozitivi. Pentru metoda cu micro-godeuri a MLA, mutanții din colonii mici sunt definiți a fi cei care acoperă mai puțin de 25 % din diametrul godeului, iar mutanții din colonii mari cei care acoperă mai mult de 25 % din diametrul godeului. Pentru metoda agar-agar, se utilizează un contor de colonii automat pentru numărarea și dimensionarea coloniilor de mutanți. Metodele utilizate pentru dimensionarea coloniilor sunt prezentate în detaliu în literatură (19) (38) (40). Caracterizarea coloniilor la martorii negativi și pozitivi este necesară pentru a demonstra că studiile sunt realizate în mod adecvat.

43. Substanța chimică de testat nu poate fi determinată ca fiind negativă dacă mutanții, atât cei din coloniile mari, cât și cei din coloniile mici nu sunt detectați corespunzător în martorul pozitiv. Caracterizarea coloniilor poate fi utilizată pentru a furniza informații generale privind capacitatea substanței chimice de testat de a cauza mutații punctiforme și/sau evenimente cromozomiale (punctul 4).

44. TK6: Diferența dintre mutanții care cresc normal și cei care cresc lent este indicată prin diferența de la nivelul timpului de incubare (a se vedea punctul 40). Pentru TK6, se punctează, în general, atât mutanții care se formează timpuriu, cât și cei care se formează tardiv, pentru toate culturile, inclusiv martorii negativi și pozitivi. Caracterizarea coloniilor la martorii negativi și pozitivi este necesară pentru a demonstra că studiile sunt realizate în mod adecvat. Substanța chimică de testat nu poate fi determinată ca fiind negativă dacă atât mutanții care se formează timpuriu, cât și cei care se formează tardiv nu sunt detectați corespunzător în martorul pozitiv. Caracterizarea coloniilor poate fi utilizată pentru a furniza informații generale privind capacitatea substanței chimice de testat de a cauza mutații punctiforme și/sau evenimente cromozomiale (punctul 4).

▼M8

Competența de laborator

45. Pentru a demonstra o experiență suficientă în materie de testare înainte de utilizarea acestuia pentru efectuarea testelor de rutină, laboratorul ar trebui să fi efectuat o serie de experiențe cu substanțe pozitive de referință care acționează prin diferite mecanisme (cel puțin una cu și una fără activare metabolică, alese dintre substanțele enumerate în tabelul 1) și diferiți martori negativi (inclusiv culturi netratate și diferiți solvenți/diferite vehicule). Aceste răspunsuri ale martorilor pozitivi și negativi ar trebui să fie în concordanță cu referințele bibliografice. Această cerință nu se aplică laboratoarelor care au experiență, și anume, cele care au o bază de date anterioare disponibilă, astfel cum este definit la punctele 47-50. În cazul MLA, valorile obținute pentru martorii pozitivi și cei negativi ar trebui să fie în concordanță cu recomandările IWGT (a se vedea tabelul 2).

46. În absența activării metabolice ar trebui să se examineze o selecție de substanțe martor pozitive (a se vedea tabelul 1) în cadrul unor tratamente pe termen scurt și lung (dacă se utilizează tratamente pe termen lung) și, de asemenea, în cadrul tratamentelor pe termen scurt, în prezența activării metabolice, pentru a demonstra capacitatea de a detecta substanțele chimice mutagene, pentru a determina eficacitatea sistemului de activare metabolică și pentru a demonstra caracterul adecvat al condițiilor de creștere a celulelor în timpul tratamentului, al manifestării fenotipice și al selecției celulelor mutante, precum și al procedurilor de punctare. Ar trebui să se aleagă o plajă de valori ale concentrațiilor substanțelor chimice selectate astfel încât să se obțină creșteri reproductibile și legate de concentrație peste nivelul de fond pentru a demonstra sensibilitatea și gama dinamică a sistemului de testare.

Date anterioare privind martorii testați

47. Laboratorul ar trebui să stabilească:

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor pozitivi testați anterior,

— o plajă de valori și o distribuție a martorilor negativi (netratați, solvenți) testați anterior.

48. La obținerea primelor date pentru o distribuție a martorilor negativi testați anterior, martorii negativi testați în paralel trebuie să fie în concordanță cu datele publicate referitoare la martori negativi. Pe măsură ce se adaugă mai multe date experimentale la distribuția martorilor, martorii negativi testați în paralel ar trebui să se încadreze, în mod ideal, în limita de 95 % a martorilor din distribuția respectivă (64) (65).

49. Baza de date privind martori negativi testați anterior a laboratorului ar trebui să fie construită inițial cu cel puțin 10 experimente, dar ar fi de preferat să conțină cel puțin 20 de experimente efectuate în conformitate cu condiții experimentale comparabile. Laboratoarele ar trebui să utilizeze metode de control al calității precum grafice de control [de exemplu, diagrame C sau X (65)] pentru a identifica gradul de variabilitate al datelor privind martorii negativi și pozitivi ale acestora și pentru a dovedi faptul că metodologia se află „sub control” în cadrul respectivului laborator (66). Referințele bibliografice prezintă detalii și recomandări suplimentare privind modul de dezvoltare și utilizare a datele istorice (64).

50. Datele privind martorii negativi ar trebui să constea în frecvențe ale celulelor mutante dintr-o cultură unică sau, de preferință, din culturi duplicate, astfel cum este descris la punctul 27. Martorii negativi testați în paralel ar trebui să se încadreze, în mod ideal, în limita de 95 % a martorilor din distribuția bazei de date privind martorii negativi testați în paralel a laboratorului. În cazul în care datele privind martorii negativi se situează în afara limitei de 95 % a martorilor, acestea pot fi acceptabile pentru a fi incluse în distribuția martorilor testați anterior, în măsura în care datele respective nu reprezintă valori aberante extreme, există dovezi că sistemul de testare se află „sub control” (a se vedea punctul 49) și nu există nicio dovadă a unor erori tehnice sau umane.

▼M8

51. Orice modificare a protocolului experimental ar trebui să fie avută în vedere sub aspectul coerenței datelor cu bazele de date existente ale laboratorului cu privire la martorii testați anterior. Orice inconsecvență majoră ar trebui să conducă la stabilirea unei noi baze de date privind martorii testați anterior.

DATE ȘI RAPORTARE

Prezentarea rezultatelor

52. Prezentarea datelor atât pentru MLA, cât și pentru TK6 ar trebui să includă, atât pentru culturile tratate, cât și pentru cele martor, datele necesare pentru calcularea citotoxicității (RTG sau, respectiv, RS) și frecvențele mutanților, conform descrierii de mai jos.

53. În cazul MLA, ar trebui să se furnizeze date cu privire la fiecare cultură pentru RSG, RTG, eficacitatea clonării în momentul selecției mutanților și numărul de colonii de mutanți (pentru versiunea cu agar-agar) sau numărul de godeuri goale (pentru versiunea cu micro-godeuri). MF ar trebui exprimat ca număr de celule mutante la un milion de celule supraviețuitoare. Dacă răspunsul este pozitiv, valorile MF pentru colonii mici și mari (și/sau procentul MF total) ar trebui să fie date pentru cel puțin o concentrație a substanței chimice de testat (în general, cea mai mare concentrație pozitivă) și a martorilor negativi și pozitivi. În cazul unui răspuns negativ, ar trebui să fie furnizate valorile MF pentru coloniile mici și cele mari pentru martorul negativ și cel pozitiv.

54. În cazul TK6, ar trebui să fie furnizate date despre fiecare cultură pentru RS, eficacitatea clonării în momentul selecției mutanților și numărul godeurilor goale pentru mutanții care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv. MF ar trebui să fie exprimată ca număr de celule mutante pe număr de celule supraviețuitoare și ar trebui să includă valoarea MF totală, precum și MF (și/sau procentul MF total) pentru mutații care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv.

Criterii de acceptabilitate

55. Atât pentru MLA, cât și pentru TK6, ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii înainte de a determina rezultatele globale pentru o anumită substanță chimică de testat:

— au fost aplicate două condiții experimentale (tratament scurt cu și fără activare metabolică - a se vedea punctul 33), cu excepția cazului în care una a generat rezultate pozitive.

— Ar trebui să se poată analiza un număr adecvat de celule și concentrații (a se vedea punctele 27, 34-36).

— Criteriile de selecție a concentrației maxime sunt conforme cu cele descrise la punctele 28-30.

Criterii de acceptabilitate pentru martorii negativi și pozitivi

56. Analiza Grupului de lucru de experți MLA din cadrul IWGT asupra unei cantități mari de date MLA a culminat cu un consens internațional cu privire la criteriile de acceptabilitate specifice pentru MLA (1) (2) (3) (4) (5). Prin urmare, această metodă de testare oferă recomandări specifice pentru determinarea acceptabilității martorilor negativi și pozitivi și pentru evaluarea rezultatelor fiecărei substanțe în cadrul MLA. TK6 are o bază de date mult mai mică și nu a făcut obiectul unei evaluări de către un grup de lucru.

▼M8

57. În cazul MLA, fiecare experiment ar trebui să fie evaluat cu privire la problema dacă martorul netratat/tratat cu solvent îndeplinește criteriile de acceptare ale grupului de lucru MLA din cadrul IWGT [punctul (4) și tabelul 2 de mai jos] pentru: (1) MF (este de remarcat faptul că valorile acceptabile ale IWGT sunt diferite de versiunile cu agar-agar și cu micro-godeuri ale MLA), (2) eficacitatea clonării (CE) în momentul selectării mutanților și (3) creșterea suspensiei (SG) pentru martorul tratat cu solvent (a se vedea formulele din apendicele 2).

Tabelul 2

Criterii de acceptabilitate pentru MLA

Parametru	Metoda agar-agar moale	Metoda cu micro-godeuri
Frecvența mutanților	35-140 × 10^{-6}	50-170 × 10^{-6}
Eficacitatea clonării	65-120 %	65-120 %
Creșterea suspensiei	de 8-32 de ori (3-4 ore de tratament) de 32-180 de ori (24 de ore de tratament, dacă este efectuat)	de 8-32 de ori (3-4 ore de tratament) de 32-180 de ori (24 de ore de tratament, dacă este efectuat)

58. În cazul MLA, fiecare test ar trebui să fie evaluat, de asemenea, cu privire la problema dacă martorul (martorii) pozitiv(i) respectă cel puțin unul dintre următoarele două criterii de acceptare elaborate de grupul de lucru din cadrul IWGT:

— Martorul pozitiv ar trebui să demonstreze o creștere absolută a valorii MF totale, și anume, o creștere peste fondul spontan MF [o valoare MF (IMF) indusă] de cel puțin 300 × 10^{-6}. Cel puțin 40 % din valoarea IMF ar trebui să se reflecte în MF aferent coloniilor mici.

— Un martor pozitiv înregistrează o creștere a valorii MF a coloniei mici cu cel puțin 150 × 10^{-6} peste valoarea înregistrată la martorul netratat/tratat cu solvent testat în paralel (o valoare IMF a coloniei mici de 150 × 10^{-6}).

59. Pentru TK6, va fi acceptabil un test dacă martorul negativ testat în paralel este considerat acceptabil pentru a fi adăugat în baza de date privind martorii negativi testați anterior a laboratorului, astfel cum este descris la punctele 48-49. În plus, martorii pozitivi testați în paralel (a se vedea punctul 32) ar trebui să inducă răspunsuri compatibile cu cele provenite din baza de date privind martorii pozitivi testați anterior și să producă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel.

60. Pentru ambele teste, limita superioară de citotoxicitate observată la cultura de martori pozitivi ar trebui să fie aceeași cu cea a culturilor experimentale. Adică RTG/RS nu ar trebui să fie sub 10 %. Este suficient să se utilizeze o singură concentrație (sau una dintre concentrațiile culturilor de martori pozitivi în cazul în care se utilizează mai multe concentrații) pentru a demonstra că au fost îndeplinite criteriile de acceptare pentru martorul pozitiv. În plus, valoarea MF a martorului pozitiv trebuie să se situeze în intervalul acceptabil stabilit pentru laborator.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

61. În cazul MLA, grupul de lucru de experți privind limfomul la șoarece (The Mouse Lymphoma Expert Workgroup) din cadrul IWGT a desfășurat o activitate intensă cu privire la relevanța biologică și criteriile pentru un răspuns pozitiv. Prin urmare, prezenta metodă de testare oferă recomandări specifice pentru interpretarea rezultatelor substanțelor chimice de testat din

▼M8

MLA (a se vedea punctele 62-64). TK6 are o bază de date mult mai mică și nu a făcut obiectul unei evaluări de către un grup de lucru. Prin urmare, recomandările pentru interpretarea datelor pentru TK6 sunt prezentate în termeni mai generali (a se vedea punctele 65-66). Pentru ambele teste se aplică recomandări suplimentare (a se vedea punctele 67-71).

MLA

62. Se recomandă o abordare pentru definirea răspunsurilor pozitive și negative, pentru a se asigura relevanța biologică a creșterii MF. În locul analizei statistice utilizate, în general, pentru alte teste, aceasta se bazează pe utilizarea unei frecvențe predefinite a mutanților (și anume, o creștere a MF peste cea a martorului testat în paralel), care a fost denumită factor de evaluare globală (GEF) și care se bazează pe analiza distribuției datelor privind MF a martorul negativ din laboratoarele participante (4). Pentru versiunea cu agar-agar a MLA, GEF este 90×10^{-6} și pentru versiunea cu micro-godeuri a MLA, GEF este 126×10^{-6}.

63. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă dacă, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33), creșterea MF peste fondul testat în paralel depășește GEF, iar creșterea este legată de concentrație (de exemplu, prin utilizarea unui test al tendințelor). Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi capabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

64. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă dacă, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33) nu există niciun răspuns legat de concentrare sau, dacă există o creștere a MF, aceasta nu depășește GEF. Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

TK6

65. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar pozitivă dacă, în oricare dintre condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33):

— cel puțin una dintre concentrațiile de testare prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței corespunzător, creșterea depinde de concentrație (a se vedea punctul 33)

— Oricare dintre aceste rezultate se situează în afara distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 48).

La îndeplinirea tuturor acestor criterii, se consideră că substanța chimică de testat poate produce mutații în cadrul acestui sistem de testare. Referințele bibliografice prezintă recomandări pentru cele mai adecvate metode statistice (66) (67).

66. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi în mod clar negativă în cazul în care, în toate condițiile experimentale examinate (a se vedea punctul 33):

— niciuna dintre concentrațiile de testare nu prezintă o creștere semnificativă din punct de vedere statistic în comparație cu martorul negativ testat în paralel,

— atunci când este evaluată prin intermediul unui test de stabilire a tendinței, nu se înregistrează nicio creștere legată de concentrație,

▼**M8**

— toate rezultatele se situează în interiorul distribuției de date cu privire la martorii negativi testați anterior (de exemplu, limita de control de 95 % pe baza distribuției Poisson; a se vedea punctul 48).

Atunci substanța chimică de testat este considerată a fi incapabilă de a induce mutații în cadrul acestui sistem de testare.

Pentru MLA și TK6:

67. În cazul în care concentrația maximă se bazează pe citotoxicitate, cea mai mare concentrație ar trebui să ajungă la valori ale RTG/RS situate între 20 și 10 %. Consensul este că ar trebui să se acorde atenție atunci când se interpretează rezultate pozitive aflate numai între 20 și 10 % RTG/RS, iar rezultatul nu ar fi considerat pozitiv în cazul în care creșterea MF s-ar produce doar la 10 % RTG/RS sau sub această valoare (dacă este evaluată) (2) (59).

68. Există anumite circumstanțe în care este posibil să se stabilească, prin informații suplimentare, dacă o substanță chimică de testat nu este mutagenă atunci când nu există o cultură care să indice o valoare RTG între 10-20 % RTG/RS. Aceste situații sunt prezentate în continuare: (1) Nu există nicio dovadă de mutagenicitate (de exemplu, absența unui răspuns la doză, nicio frecvență a mutanților peste celor observate la martorii negativi testați în paralel sau în intervalele de fond istorice etc.) într-o serie de puncte de date în intervalul 100 %-20 % RTG/RS și există cel puțin un punct de date între 20 și 25 % RTG/RS. (2) Nu există nicio dovadă de mutagenicitate (de exemplu, absența unui răspuns la doză, nicio frecvență a mutanților peste celor observate la martorii negativi testați în paralel sau în intervalele de fond istorice etc.) într-o serie de puncte de date în intervalul 100 %-20 % RTG/RS și există, de asemenea, un punct de date negativ sub 10 % RTG/RS. În ambele situații, se poate concluziona că substanța chimică de testat este negativă.

69. Nu există nicio cerință referitoare la verificarea unui răspuns clar pozitiv sau negativ.

70. În cazul în care răspunsul nu este nici în mod clar negativ, nici în mod clar pozitiv, astfel cum este descris mai sus și/sau pentru a ajuta la stabilirea relevanței biologice a unui rezultat, datele ar trebui să fie evaluate de către experți și/sau prin intermediul unor investigații suplimentare. Ar putea fi utilă repetarea unui experiment, eventual folosind condiții experimentale modificate [de exemplu, stabilirea unei distanța între concentrații pentru a crește probabilitatea de a atinge puncte de date în intervalul 10-20 % RTG/RS, utilizând alte condiții de activare metabolică (și anume, concentrație S9 sau origine S9) și durata tratamentului].

71. În cazuri rare, chiar și după efectuarea de investigații suplimentare, setul de date va exclude posibilitatea stabilirii unei concluzii pentru rezultate pozitive sau negative. Prin urmare, răspunsul substanței chimice de testat ar trebui să fie concluzionat ca fiind echivoc (interpretat cu aceeași probabilitate de a fi pozitiv sau negativ).

RAPORT TESTULUI

72. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat:

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile;

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

▼**M8**

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Solvent:

— justificarea alegerii solventului;

— procentul de solvent în mediul final de cultură.

Celule:

Pentru culturile principale din laborator:

— tipul și sursa celulelor, precum și datele anterioare din laboratorul de testare;

— caracteristicile cariotipului și/sau numărul modal de cromozomi;

— metode de întreținere a culturilor de celule;

— absența micoplasmei;

— perioade de dublare a celulelor.

Condiții de testare:

— justificarea alegerii concentrațiilor și a numărului de culturi celulare; inclusiv, de exemplu, datele de citotoxicitate și limitele de solubilitate;

— compoziția mediilor de cultură, concentrația de CO_2, nivelul de umiditate;

— concentrația substanței chimice de testat, exprimată în concentrație finală în mediu de cultură (de exemplu, µg sau mg/ml sau mM din mediul de cultură);

— concentrația (și/sau volumul) de solvent și substanță chimică de testat adăugate în mediul de cultură;

— temperatura de incubare;

— timpul de incubare;

— durata tratamentului;

— densitatea celulară în timpul tratamentului;

▼**M8**

— tipul și compoziția sistemului de activare metabolică (sursa fracției S9, metoda de preparare a amestecului S9, concentrația și volumul amestecului S9 și fracția S9 în mediul final de cultură, controalele de calitate ale fracției S9);

— substanțe martor pozitive și negative, concentrații finale pentru fiecare condiție de tratament;

— timpul de manifestare (inclusiv numărul de celule însămânțate, subculturile și programele de alimentare, dacă este cazul);

— identitatea agentului selectiv și a concentrației acestuia;

— pentru MLA, ar trebui să se indice versiunea utilizată (cu agar-agar sau micro-godeuri).

— criterii de acceptabilitate a testelor;

— metodele utilizate pentru numărarea celulelor viabile și mutante;

— metodele utilizate pentru măsurarea citotoxicității;

— orice alte informații suplimentare cu privire la citotoxicitate și metoda utilizată;

— durata perioadelor de incubare după placare;

— definirea coloniilor pentru care se ține seama de dimensiuni și de tip (inclusiv criteriile pentru coloniile "mici" și "mari", dacă este cazul).

— criteriile conform cărora un studiu poate fi considerat ca fiind pozitiv, negativ sau echivoc;

— metode utilizate pentru a determina pH-ul, osmolalitatea, dacă este testată, și precipitarea, dacă este relevant.

Rezultate:

— numărul de celule tratate și numărul de celule subcultivate pentru fiecare cultură;

— parametrii de toxicitate (RTG pentru MLA și RS pentru TK6);

— semne de precipitare și ora determinării;

— numărul de celule placată în mediu selectiv și neselectiv;

— numărul de colonii în mediul neselectiv și numărul de colonii rezistente în mediu selectiv și frecvențele celulelor mutante aferente;

— dimensionarea coloniilor pentru martorii negativi și pozitivi și dacă substanța chimică de testat este pozitivă, cel puțin o concentrație, precum și frecvențele aferente ale mutanților;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— date (concentrație și solvenți) privind martorii negativi (solvent) și pozitivi testați în paralel;

— date cu privire la martorii negativi (tratați cu solvent) și pozitivi testați anterior (concentrații și solvenți) cu intervale, valori medii și abateri standard; numărul de teste pe care se bazează martorii testați anterior;

▼M8

— analize statistice (pentru culturi individuale și duplicate grupate, dacă este cazul) și valori p, dacă există; și pentru MLA, evaluarea GEF.

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. și Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. și Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. și Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. și Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, nr. 234, OCDE, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. și O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. și Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. și Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. și Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. SUA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. și Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. și Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. și Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. și Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. și Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. și Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. și Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. și Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. și Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. și Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. și Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. și Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. și Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. și Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. și Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. și Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. și Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. și Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. și Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. și DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. și Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. și Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. și Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. și Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. și Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. În: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z și Caldwell(Eds), a doua ediție, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. și Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. și Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. și Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. și Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. și Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. și De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. și Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. și Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. și Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. În: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. și Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Programul Organizației Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. și McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. În: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.și Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. și Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. și Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. În: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. și Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. și Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Publicație disponibilă la adresa: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. și Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. și Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. și Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. și Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York, a doua ediție.

(66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 199), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. și Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, a treia ediție, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Aneugen: orice substanță sau proces chimic care, prin interacțiunea cu componentele ciclului celular de diviziune mitotică și meiotică, conduce la apariția aneuploidiei la celule sau organisme.

Aneuploidie: orice abatere de la numărul diploid (sau haploid) normal de cromozomi cu unul sau mai mulți cromozomi, dar nu cu un set (seturi) întreg (întregi) de cromozomi (poliploidie).

Mutageni care provoacă substituția perechilor de bază: substanțe chimice care provoacă substituția perechilor de bază în ADN.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

Eficacitatea clonării: Procentul de celule placate la o densitate scăzută, care pot crește într-o colonie care poate fi numărată.

Clastogen: orice substanță sau proces chimic care cauzează aberații cromozomiale structurale la populații de celule sau organisme.

Citotoxicitate: pentru analizele incluse în prezenta metodă de testare, citotoxicitatea este identificată ca o reducere a creșterii relative totale (RSG) sau a supraviețuirii relative (RS) pentru MLA și, respectiv, TK6.

Mutație directă: o mutație a genelor de la forma parentală la forma mutantă care generează o modificare sau o pierdere a activității enzimatice sau a funcției proteinei codificate.

Mutageni de decalare a cadrului de citire: substanțe chimice care provoacă adăugarea sau ștergerea uneia sau a mai multor perechi de bază din molecula de ADN.

Genotoxic: termen general cuprinzând toate tipurile de leziuni ale ADN-ului sau ale cromozomilor, inclusiv ruperi ale ADN-ului, aducții, rearanjări, mutații, aberații cromozomiale și aneuploidie. Nu toate tipurile de efecte genotoxice au drept rezultat mutații sau leziuni cromozomiale stabile.

Recombinare mitotică: în timpul mitozei, recombinarea între cromatide omoloage, ceea ce ar putea conduce la inducerea unor rupturi duble ale șirului ADN sau la pierderea heterozigozității.

Mutagen: produce o modificare ereditară a uneia sau mai multor secvențe de perechi de bază de ADN la gene sau a structurii cromozomilor (aberații cromozomiale).

Frecvența mutanților (FM): numărul de celule mutante observate împărțit la numărul de celule viabile.

Timpul de expresie fenotipică: timpul după tratament, în care modificarea genetică se fixează în interiorul genomului și orice produse genetice preexistente sunt epuizate până la modificarea trăsăturii fenotipice.

Supraviețuire relativă (RS): RS este utilizat ca indicator al citotoxicității legate de tratament în TK6. Aceasta este eficacitatea relativă a clonării (CE) a celulelor așezate pe placă imediat după tratamentul celular, ajustată cu orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în raport cu eficacitatea clonării la martorul negativ.

▼M8

Creștere relativă în suspensie (RSG): Pentru MLA, creșterea relativă totală în suspensie, în două zile, a culturii de testare în raport cu creșterea totală în suspensie, în două zile, a martorului negativ/tratat cu solvent (Clive și Spector, 1975). RSG ar trebui să includă creșterea relativă a culturii de testare în raport cu martorul negativ/tratat cu solvent în perioada tratamentului.

Creștere relativă totală (RTG): Valoarea RTG este utilizată ca indicator al citotoxicității legate de tratament în MLA. Aceasta reprezintă un indicator al creșterii relative (la martorul tratat cu vehicul) a culturilor de testare în timpul tratamentului, al expresiei de două zile și în etapele de clonare a selecției mutanților ale testului. Valoarea RSG pentru fiecare cultură de testare se înmulțește cu eficacitatea relativă a clonării culturii de testare în momentul selecției mutanților și este exprimată în raport cu eficacitatea clonării martorului negativ/solvent (Clive și Spector, 1975).

Fracția S9 a ficatului: supernatant din ficat omogenizat după centrifugare la 9 000 g, și anume extract din ficat crud.

Amestec S9: amestecul dintre fracția S9 a ficatului și cofactorii necesari pentru activitatea metalică a enzimelor.

Creșterea în suspensie (SG): creșterea multiplicată a numărului de celule pe durata tratamentului și în fazele de expresie ale MLA. SG se calculează prin înmulțirea creșterii multiplicate în ziua 1 cu creșterea multiplicată din ziua 2 pentru tratamentul scurt (de 3 sau 4 ore). În cazul în care se folosește un tratament de 24 de ore, SG reprezintă creșterea multiplicată în timpul tratamentului de 24 de ore, înmulțită cu creșterile multiplicate din zilele de expresie 1 și 2.

Martor tratat cu solvent: Termen general pentru a defini culturile martor care primesc doar solventul, care este utilizat pentru a dizolva substanța chimică de testat.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Martori netratați: Martorii netratați sunt culturi care nu beneficiază de niciun tratament (și anume, nici cu substanță chimică de testat, nici cu solvent), dar care sunt prelucrate în mod simultan culturilor care beneficiază de tratament cu substanță chimică de testat.

▼M8

Apendicele 2

FORMULE

Citotoxicitate

În cazul ambelor versiuni (cu agar-agar și micro-godeuri) ale MLA

Citotoxicitatea este definită ca fiind creșterea relativă totală (RSG), care include creșterea relativă în suspensie (RSG) în perioada de expresie de două zile și eficacitatea relativă a clonării (RCE) obținută în momentul selecției mutanților. Valorile RTG, RSG și RCE sunt toate exprimate ca procente.

Calcularea RSG: Creșterea în suspensie 1 (SG_1) constituie rata de creștere între ziua 0 și ziua 1 (concentrația celulelor în ziua 1/concentrația celulelor în ziua 0) și creșterea în suspensie 2 (SG_2) reprezintă rata de creștere între ziua 1 și ziua 2 (concentrația celulelor în ziua 2/concentrația celulelor în ziua 1). RSG reprezintă SG totală (SG_1 x SG_2) pentru cultura tratată comparativ cu martorul netratat/tratat cu solvent. Și anume: RSG = $[SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}]$ / $[SG_{1(martor)}$ x $SG_{2(martor)}]$ Valoarea SG_1 ar trebui să fie calculată de la concentrația inițială de celule utilizate la începutul tratamentului aplicat celulelor. Aceasta reflectă orice citotoxicitate diferențială care apare la cultura (culturile) de testare în timpul tratamentului celulelor.

RCE reprezintă eficacitatea relativă a clonării culturilor de testare comparativ cu eficacitatea relativă a clonării la martorul netratat/tratat cu solvent obținută la momentul selecției mutanților.

Creștere relativă totală (RTG): RTG = RSG x RCE

TK6

Supraviețuirea relativă (RS):

Citotoxicitatea este evaluată prin supraviețuirea relativă, și anume, eficacitatea clonării (EC) celulelor placate imediat după tratament, ajustată prin orice pierdere de celule în timpul tratamentului, în comparație cu eficacitatea clonării la martorii negativi (se atribuie o rată de supraviețuire de 100 %). Ajustarea pentru pierderea de celule în timpul tratamentului poate fi calculată după cum urmează:

$$\text{CE ajustat} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

RS pentru o cultură tratată cu o substanță chimică de testat se calculează după cum urmează:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Frecvența mutanților pentru MLA și TK6

Frecvența mutanților (MF) reprezintă eficacitatea clonării coloniilor de mutanți în mediu selectiv (CE_M) ajustată la eficacitatea clonării în mediu neselectiv la momentul selecției mutanților (CE_V). Și anume, MF = CE_M/CE_V. Calculul pentru aceste două valori de eficacitate a clonării este descris mai jos pentru metodele de clonare cu agar-agar și cu micro-godeuri.

▼**M8**

Versiunea MLA cu agar-agar*:* În versiunea MLA cu agar-agar, numărul de colonii de pe placa de selecție a mutanților (C_M) și numărul de colonii de pe placa fără selecție sau cu eficacitate a clonării (număr fiabil) (C_V) se obțin prin numărarea directă a clonelor. Atunci când sunt așezate pe placă 600 de celule pentru plăcile cu eficacitatea clonării (CE) în vederea selecției mutanților (CE_M) și plăcile fără selecție sau cu eficacitatea clonării (număr viabil) (CE_V) și 3 x 10^6, celulele sunt utilizate pentru selecția mutanților,

$CE_M = C_M/(3 \times 10^6) = (C_M/3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V/600$

Versiunea MLA și TK6 cu micro-godeuri: În versiunea MLA cu micro-godeuri, C_M și C_V sunt determinate ca fiind produsul numărului total de micro-godeuri (TW) și al numărului probabil de colonii pe godeu (P) pe plăcile cu micro-godeuri.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Pornind de la termenul zero al distribuției Poisson (Furth et al., 1981), P este dat de

$P = - \ln (EW / TW)$

Unde EW reprezintă godeurile goale, iar TW reprezintă numărul total de godeuri. Prin urmare,

$CE_M = C_M /T_M = (P_M \times TW_M)/T_M$

$CE_V = C_V /T_V = (P_V \times TW_V)/T_V$

În cazul versiunii MLA cu micro-godeuri, frecvențele mutanților din colonii mici și mari vor fi calculate în mod identic, utilizându-se numărul relevant de godeuri goale pentru coloniile mici și mari.

În cazul TK6, frecvențele mutanților din coloniile mici și mari se bazează pe mutanții care se formează timpuriu și cei care se formează tardiv.

▼M8

B.68. **METODĂ DE TESTARE IN VITRO PRIN EXPUNERE PE TERMEN SCURT PENTRU IDENTIFICAREA i) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE PRODUC LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ ȘI A ii) SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 491 (2017). Metoda de testare prin expunere pe termen scurt (STE) este o metodă *in vitro* care poate fi utilizată în anumite circumstanțe și cu limitări specifice pentru clasificarea și etichetarea pericolelor pe care le prezintă substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziunea oculară gravă, precum și cele care nu necesită o clasificare pentru leziunea oculară gravă sau pentru iritația oculară, astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS) al Organizației Națiunilor Unite (ONU) (1) și de Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]).

2. Potențialul de pericol pentru ochi al substanțelor chimice a fost evaluat timp de mulți ani, în primul rând prin utilizarea unui test *in vivo* pe ochi de iepure [MT B.5 (8), echivalent cu OCDE TG nr. 405]. Este general acceptat faptul că, în viitorul apropiat, niciun test alternativ *in vitro* nu va putea înlocui în totalitate testul *in vivo* pe ochi de iepure pentru a estima întreaga gamă de răspunsuri privind leziunea oculară gravă/iritația oculară pentru diferite clase de substanțe chimice. Cu toate acestea, combinațiile strategice de metode de testare alternative utilizate în cadrul unei strategii de testare (etapizate) ar putea înlocui foarte bine pe deplin testul pe ochi de șoarece (2). Abordarea descendentă este concepută pentru testarea substanțelor chimice care pot fi prevăzute, pe baza informațiilor existente, a avea un potențial iritant ridicat sau a provoacă leziunea oculară gravă. În schimb, abordarea ascendentă este concepută pentru testarea substanțelor chimice care pot fi prevăzute, pe baza informațiilor existente, a nu provoca o iritație oculară suficientă pentru a impune o clasificare. În timp ce metoda de testare STE nu este considerată a fi o înlocuire completă a testului *in vivo* pe ochi de iepure, aceasta este adecvată pentru a fi utilizată în cadrul unei strategii de testare etapizate pentru clasificarea și etichetarea reglementară, cum ar fi metoda descendentă/ascendentă, pentru a identifica fără testare suplimentară (i) substanțele chimice care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și (ii) substanțele chimice (cu excepția substanțelor foarte volatile și a tuturor substanțelor chimice solide, altele decât surfactanții) care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără clasificare în GHS al ONU/Regulamentul CLP) (1) (2). Cu toate acestea, o substanță chimică care nu este nici prevăzută a provoca leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nici încadrată într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP (nu provoacă nici leziunea oculară gravă și nici iritația oculară) prin metoda de testare STE ar trebui să fie supusă unor teste suplimentare pentru stabilirea unei clasificări definitive. În plus, ar trebui să se consulte autoritățile de reglementare competente înainte de utilizarea STE în cadrul unei abordări ascendente în conformitate cu alte scheme de clasificare decât GHS al ONU/Regulamentul CLP. Alegerea celei mai adecvate metode de testare și utilizarea acestei metode de testare ar trebui să fie avută în vedere în contextul documentului de orientare al OCDE referitor la o strategie integrată privind testarea și evaluarea pentru leziunea oculară gravă și iritația oculară (14).

3. Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedurile utilizate pentru a evalua potențialul de pericol pentru ochi al unei substanțe chimice de testat, pe baza capacității acesteia de a induce citotoxicitatea în cadrul metodei de testare prin expunere pe termen scurt. Efectul citotoxic al substanțelor

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

chimice asupra celulelor epiteliale corneene este un mod important de acțiune (MOA) care determină lezarea epiteliului cornean și iritația oculară. Viabilitatea celulară este evaluată în cadrul metodei de testare STE prin măsurarea cantitativă, după extragerea din celule a sării de formazan de culoare albastră produsă de celulele vii prin conversia enzimatică a colorantului vital MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu], cunoscut și sub denumirea de bromură de tiazolil albastru tetrazoliu (3). Viabilitatea celulară obținută este comparată cu martorul tratat cu solvent (viabilitate relativă) și se utilizează pentru estimarea potențialului de pericol pentru ochi al substanței chimice de testat. O substanță chimică de testat este încadrată în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP atunci când ambele concentrații 5 % și 0,05 % determină o viabilitate celulară mai mică decât sau egală cu (≤) 70 %. Invers, o substanță chimică este prevăzută a fi neîncadrată în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP atunci când ambele concentrații de 5 % și 0,05 % determină o viabilitate celulară mai mare decât (>) 70 %.

4. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare STE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor. Definițiile sunt prezentate în apendice.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

5. Această metodă de testare se bazează pe un protocol elaborat de Kao Corporation (4), care a făcut obiectul a două studii de validare diferite: unul realizat de către Comitetul de validare al Societății japoneze pentru alternative la experimentele pe animale (JSAAE) (5) și altul de către Centrul japonez pentru validarea metodelor alternative (JaCVAM) (6). O evaluare inter pares a fost realizată de NICEATM/ICCVAM pe baza rapoartelor studiilor de validare și a documentelor de analiză de fond privind metoda de testare (7).

6. Atunci când sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1), datele obținute prin metoda de testare STE cu privire la 125 de substanțe chimice (inclusiv substanțe și amestecuri) au arătat o precizie generală de 83 % (104/125), o rată de rezultate fals pozitive de 1 % (1/86) și o rată de rezultate fals negative de 51 % (20/39) în comparație cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (7). Rata de rezultate fals negative obținută nu este esențială în contextul de față, întrucât toate substanțele chimice de testat care induc o viabilitate celulară de ≤ 70 % la o concentrație de 5 % și > 70 % la o concentrație de 0,05 % ar fi testate ulterior cu alte metode de testare *in vitro* validate în mod adecvat sau, ca o ultimă opțiune, în cadrul testului *in vivo* pe ochi de iepure, în funcție de cerințele de reglementare și în conformitate cu strategia de testare secvențială și cu abordările bazate pe dovezi recomandate în prezent (1) (8). Au fost testate, în principal, substanțe monocomponente, deși există, de asemenea, o cantitate limitată de date privind testarea amestecurilor. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință de reglementare pentru testarea amestecului. Metoda de testare STE nu a prezentat alte deficiențe specifice atunci când a fost utilizată pentru identificarea substanțelor chimice de testat ca fiind încadrate în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP. Cercetătorii ar putea lua în calcul utilizarea acestei metode de testare pentru substanțe chimice de testat; prin aceasta, viabilitatea celulară de ≤ 70 % la concentrații de 5 % și 0,05 % ar trebui să fie acceptată ca indicator al unui răspuns care induce leziunea oculară gravă care ar trebui să fie încadrată în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP fără teste suplimentare.

▼**M8**

7. Atunci când sunt utilizate pentru a identifica substanțele chimice (substanțe și amestecuri) care nu necesită clasificarea pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1), datele obținute prin metoda de testare STE cu privire la 130 de substanțe chimice (inclusiv substanțe și amestecuri) au arătat o precizie generală de 85 % (110/130), o rată de rezultate fals negative de 12 % (9/73) și o rată de rezultate fals pozitive de 19 % (11/57) în comparație cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (7). În cazul în care sunt excluse din setul de date substanțele puternic volatile și substanțele solide, altele decât surfactanții, precizia totală se îmbunătățește, ajungând la 90 % (92 /102), rata de rezultate fals negative la 2 % (1/54) și rata de rezultate fals pozitive la 19 % (9/48) (7). În consecință, eventualele deficiențe ale metodei de testare STE, atunci când aceasta este utilizată pentru a identifica substanțe chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU/Regulamentul CLP), reprezintă o rată ridicată de rezultate fals negative pentru i) substanțe foarte volatile, cu o presiune a vaporilor peste 6 kPa și (ii) substanțe chimice solide (substanțe și amestecuri), altele decât surfactanții și amestecurile alcătuite exclusiv din surfactanți. Aceste substanțe chimice sunt excluse din domeniul de aplicabilitate al metodei de testare STE (7).

8. În plus față de substanțele chimice menționate la punctele (6) și (7), setul de date generat prin metoda STE conține, de asemenea, date interne privind 40 de amestecuri, care, atunci când au fost comparate cu testul Draize *in vivo* pe ochi, au arătat o precizie de 88 % (35/40), o rată de rezultate fals pozitive de 50 % (5/10) și o rată de rezultate fals negative de 0 % (0/30) pentru estimarea amestecurilor care nu necesită încadrare în sistemele de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP (9). Prin urmare, metoda de testare STE poate fi aplicată pentru a identifica amestecuri ca nefiind încadrate în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, în cadrul unei abordări ascendente, cu excepția amestecurilor solide, altele decât cele care sunt compuse doar din surfactanți, ca o extindere a limitării sale la substanțe solide. În plus, amestecurile care conțin substanțe cu o presiune a vaporilor mai mare de 6 kPa ar trebui evaluate cu atenție pentru a se evita posibile previziuni insuficiente, acestea trebuind să fie justificate de la caz la caz.

9. Metoda de testare STE nu poate fi utilizată pentru identificarea substanțelor chimice de testat ca fiind încadrate în categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP sau în categoria 2A (iritație oculară) sau 2B (iritație oculară ușoară), având în vedere numărul considerabil de substanțe chimice din categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP care sunt estimate insuficient ca fiind încadrate în categoria 2, 2A sau 2B, precum și de substanțe chimice neîncadrate în nicio categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, care sunt estimate insuficient ca fiind încadrate în categoria 2, 2A sau 2B (7). În acest scop, ar putea fi necesare teste suplimentare utilizând o altă metodă adecvată.

10. Metoda de testare STE este adecvată pentru substanțele chimice de testat care sunt dizolvate sau suspendate uniform pentru cel puțin 5 minute într-o salină fiziologică, cu 5 % dimetilsulfoxid (DMSO) în soluție salină sau ulei mineral. Metoda de testare STE nu este adecvată pentru substanțele chimice de testat care sunt insolubile sau nu pot fi suspendate uniform pentru cel puțin 5 minute într-o salină fiziologică, cu 5 % DMSO în soluție salină sau ulei mineral. Utilizarea de ulei mineral în metoda de testare STE este posibilă datorită expunerii pe termen scurt. Așadar, metoda de testare STE este adecvată pentru estimarea potențialului de pericol pentru ochi al substanțelor chimice de testat insolubile în apă (de exemplu, alcooli grași sau cetone cu lanț lung), cu condiția ca acestea să fie miscibile în cel puțin unul dintre cei trei solvenți propuși mai sus (4).

▼M8

11. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării ([1]) și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare STE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. Metoda de testare STE este o analiză *in vitro* bazată pe citotoxicitate, care este efectuată pe un monostrat confluent de celule Statens Serumaninstitut Rabbit Cornea (SIRC) cultivate pe o microplacă din policarbonat cu 96 de godeuri (4). După o expunere de cinci minute la o substanță chimică de testat, citotoxicitatea este măsurată cantitativ ca viabilitate relativă a celulelor SIRC prin analiza MTT (4). Viabilitatea celulară scăzută este utilizată pentru a estima eventualele efecte adverse care determină leziuni oculare.

13. S-a raportat că 80 % dintr-o soluție care intră în ochiul unui iepure este excretată prin intermediul sacului conjunctival în trei sau patru minute, în timp ce peste 80 % dintr-o soluție care intră în ochiul uman este excretată în unu sau două minute (10). Metoda de testare STE încearcă să aproximeze acești timpi de expunere și utilizează citotoxicitatea ca punct final pentru a evalua gradul de lezare a celulelor SIRC ca urmare a unei expuneri de cinci minute la substanța chimică de testat.

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

14. Înainte de utilizarea sistematică a metodei de testare STE descrise în prezenta metodă de testare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin clasificarea corectă a celor unsprezece substanțe recomandate în tabelul 1. Aceste substanțe au fost selectate pentru a reprezenta întreaga gamă de răspunsuri pentru leziunea oculară gravă sau iritația oculară pe baza rezultatelor testelor *in vivo* pe ochi de iepure (TG 405) și a sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentul CLP (1). Alte criterii de selecție au inclus faptul că substanțele ar trebui să fie disponibile în comerț, că ar trebui să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate și că ar trebui să fie disponibile date *in vitro* de înaltă calitate din metoda de testare STE (3). În situațiile în care o substanță inclusă pe listă nu este disponibilă sau în cazul în care acest lucru se poate justifica, se poate utiliza o altă substanță pentru care sunt disponibile date de referință *in vivo* și *in vitro* adecvate, cu condiția să se aplice aceleași criterii, astfel cum sunt descrise aici.

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare

Substanță	NR CAS	Clasa chimică ([1])	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. ([2]) din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/CLP
Clorură de benzalconiu (10 %, apoasă)	8001-54-5	Compus de tip onium	Lichid	Categoria 1	Salin	Categoria 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Lichid	Categoria 1	Salin	Categoria 1

([1]) În iunie 2013, reuniunea comună a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată acum o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat” care descrie ceea ce este testat în metodele de testare noi și actualizate.

▼**M8**

Substanță	NR CAS	Clasa chimică [1]	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. [2] din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/ CLP
Acid Red 92	18472-87-2	Compus heterociclic; Compus de brom; Compus de clor	Solid	Categoria 1	Salin	Categoria 1
Hidroxid de sodiu	1310-73-2	Alcali; Substanță chimică anorganică	Solid	Categoria 1 [3]	Salin	Categoria 1
Butirlactonă	96-48-0	Lactonă; Compus heterociclic	Lichid	Categoria 2A (Categoria 2 din CLP)	Salin	Nu se poate estima
1-octanol	111-87-5	Alcool	Lichid	Categoria 2A/ B [4](Categoria 2 din CLP)	Ulei mineral	Nu se poate estima
Ciclopentanol	96-41-3	Alcool; Hidrocarbură, ciclică	Lichid	Categoria 2A/ B [5] (Categoria 2 din CLP)	Salin	Nu se poate estima
Acetat de 2-etoxietil	111-15-9	Alcool; Eter	Lichid	Neclasificată	Salin	Neclasificată
Dodecan	112-40-3	Hidrocarbură, aciclică	Lichid	Neclasificată	Ulei mineral	Neclasificată
Metilizobutilcetonă	108-10-1	Cetonă	Lichid	Neclasificată	Ulei mineral	Neclasificată

▼M8

Substanță	NR CAS	Clasa chimică (1)	Stare fizică	*In Vivo*- Cat. (2) din GHS al ONU/CLP	Solvent în testul STE	STE - cat. din GHS al ONU/ CLP
sulfat de 1,1-dimetilguanidină	598-65-2	amidină; compus de sulf	Solid	Neclasificată	Salin	Neclasificată

(1) Distribuirea în clase de substanțe chimice s-a realizat utilizându-se informațiile obținute din publicațiile anterioare ale NICEATM și, dacă acestea nu au fost disponibile, apelându-se la vocabularul Medical Subject Headings al National Library of Medicine (MeSH®) [prin ChemIDplus® (National Library of Medicine), disponibil la adresa http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/] și utilizând determinările structurale realizate de NICEATM.

(2) Pe baza rezultatelor furnizate de testul *in vivo* pe ochi de iepure (OCDE TG nr. 405) și prin utilizarea GHS al ONU/ Regulamentului CLP (1).

(3) Încadrarea în categ. 1 se bazează pe potențialul coroziv pentru piele al soluției de 100 % hidroxid de sodiu (inclus ca substanță chimică de verificare cu potențial coroziv pentru piele în TG nr. 435 a OCDE) și pe criteriul pentru categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (1).

(4) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU de distincție între cele două categorii, și anume, 2 din 6 față de 4 din 6 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Setul de date *in vivo* a inclus două studii cu câte trei animale. Într-un studiu, două din trei animale au prezentat efecte în ziua 7, asigurând încadrarea în categ. 2A (11), în timp ce în al doilea studiu toate punctele finale la toate cele trei animale au revenit la un punctaj de zero până în ziua 7, asigurând încadrarea în categ. 2B (12).

(5) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU pentru distingerea între cele două categorii, și anume, 1 din 3 față de 2 din 3 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Studiul *in vivo* a inclus trei animale. Toate punctele finale, cu excepția opacității corneene și a roșeții specifice conjunctivei la un singur animal, au fost recuperate la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat integral până în ziua 7 avut un punctaj de opacitate corneană de 1 și roșeață atribuită conjunctivitei de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat în totalitate în ziua 14 (11).

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

PROCEDURA

Prepararea monostratului celular

15. Pentru realizarea metodei de testare STE ar trebui să se utilizeze linia celulară din cornee de iepure SIRC. Se recomandă ca celulele SIRC să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection CCL60.

16. Celulele SIRC sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate în balon de cultură conținând un mediu de cultură ce cuprinde mediul esențial minim al lui Eagle (MEM), completat cu 10 % ser fetal bovin (FBS), 2 mM L-glutamină, 50-100 de unități/ml de penicilină și 50-100 µg/ml de streptomicină. Celulele care au devenit confluente în balonul de cultură ar trebui să fie separate folosind soluție tripsină-acid etilendiaminotetraacetic, cu sau fără utilizarea unei raclete de celule. Celulele sunt propagate (de exemplu, 2-3 treceri) într-un balon de cultură înainte de a fi utilizate pentru testele de rutină și ar trebui să fie supuse unui număr maxim de 25 de treceri de la decongelare.

17. Apoi, celulele gata de utilizat pentru testul STE sunt pregătite la densitatea corespunzătoare și însămânțate în plăci cu 96 de godeuri. Densitatea celulară recomandată pentru însămânțare este de $6{,}0 \times 10^3$ de celule pe godeu atunci când celulele sunt utilizate la patru zile după însămânțare, sau $3{,}0 \times 10^3$ de celule per godeu atunci când celulele sunt utilizate la cinci zile după însămânțare, la un volum de cultură de 200 µl. Celulele utilizate pentru testul STE, care sunt însămânțate într-un mediu de cultură la o densitate adecvată, vor atinge o confluență de peste 80 % la momentul testării, și anume la patru sau cinci zile după însămânțare.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

18. Prima alegere a solventului pentru dizolvarea sau suspendarea substanțelor chimice de testat este soluția fiziologică salină. În cazul în care substanța chimică de testat demonstrează o solubilitate scăzută sau nu poate fi dizolvată sau suspendată uniform timp de cel puțin cinci minute în soluție

▼M8

salină, ca opțiune secundară de solvent se utilizează soluția cu 5 % DMSO (CAS nr. 67-68-5) în soluție salină. Pentru substanțele chimice de testat care nu pot fi dizolvate sau suspendate în mod uniform pentru cel puțin cinci minute în soluție salină sau în soluție salină cu 5 % DMSO, ca opțiune terță de solvent se utilizează uleiul mineral (CAS nr. 8042-47-5).

19. Substanțele chimice de testat se dizolvă sau se suspendă în mod uniform în solventul selectat la concentrația de 5 % (g/g) și apoi se diluează cu o diluție în serie multiplicată de 10 ori la o concentrație de 0,5 % și 0,05 %. Fiecare substanță chimică de testat trebuie să fie testată atât la concentrația de 5 %, cât și la cea de 0,05 %. Celulele cultivate pe placa cu 96 de godeuri sunt expuse la o cantitate de 200 µl/godeu, la o concentrație de 5 % sau 0,05 % din soluția (sau suspensia) cu substanță chimică de testat timp de cinci minute la temperatura camerei. Substanțele chimice de testat (substanțe monocomponente, multicomponente sau amestecuri) sunt considerate substanțe pure și diluate sau suspendate conform metodei, indiferent de puritatea lor.

20. Mediul de cultură descris la punctul 16 se utilizează ca martor de mediu pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. În plus, celulele trebuie expuse, de asemenea, la eșantioane de martor tratat cu solvent pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. Pentru solvenții prezentați la punctul 18 s-a obținut confirmarea că nu prezintă efecte adverse asupra viabilității celulelor SIRC.

21. În metoda de testare STE, va fi utilizat lauril sulfat de sodiu (SLS) cu un conținut de 0,01 % în soluție salină ca martor pozitiv pe fiecare placă din cadrul fiecărei serii de repetiții. Pentru a calcula viabilitatea celulară a martorului pozitiv, fiecare repetare placă din cadrul fiecărei repetiții trebuie să includă, de asemenea, un martor tratat cu solvent salin.

22. Este necesară o probă în vederea determinării compensației pentru densitatea optică și ar trebui să se recolteze din godeuri care conțin numai o soluție salină tamponată cu fosfat, dar fără calciu și magneziu (PBS-) sau celule.

23. Fiecare eșantion (substanță chimică de testat la 5 % și 0,05 %, martor de mediu, martor tratat cu solvent și martor pozitiv) ar trebui să fie testat în trei replici la fiecare repetiție prin expunerea celulelor la 200 µl din substanța chimică de testat sau martor corespunzătoare timp de cinci minute la temperatura camerei.

24. Substanțele de referință sunt utile pentru evaluarea potențialului iritant pentru ochi al substanțelor chimice necunoscute din cadrul unei anumite clase de substanțe sau produse chimice, sau pentru evaluarea potențialului iritant relativ al unei substanțe iritante pentru ochi într-un interval specific de reacții iritante.

Măsurarea viabilității celulare

25. După expunere, celulele sunt spălate de două ori cu 200 µl de PBS și se adaugă 200 µl de soluție de MTT (0,5 mg de MTT/ml de mediu de cultură). După un timp de reacție de două ore într-un incubator (37 °C, 5 % CO_2), soluția MTT este decantată, se extrage formazanul MTT prin adăugarea a 200 µl de 0,04 N acid hidroclorhidric-izopropanol timp de 60 minute la întuneric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanța soluției de formazan MTT la 570 nm cu un cititor de placă. Interferența substanțelor chimice de testat cu analiza MTT (prin coloranți sau reductori direcți ai MTT) se produce numai atunci când în sistemul de testare se păstrează o cantitate semnificativă de substanță chimică de testat după clătire în urma expunerii, așa cum este cazul țesutului de cornee umană reconstruit sau al țesutului de epidermă umană reconstruit 3D, dar nu este relevantă pentru culturile de celule 2D utilizate pentru metoda de testare STE.

▼M8

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

26. Valorile densității optice (DO) obținute pentru fiecare substanță chimică de testat sunt apoi utilizate pentru a calcula viabilitatea celulară raportată la martorul tratat cu solvent, care este stabilită la 100 %. Viabilitatea celulară relativă este exprimată în procente și se obține împărțind DO a substanței chimice de testat la DO a martorului tratat cu solvent, după scăderea valorii DO a soluției sărace din ambele valori.

$$Viabilitatea\ celulară(\%) = \frac{(OD_{570}\ a\ subst.chimice\ de\ testat) - (OD_{570}\ a\ soluției\ sărace)}{(OD_{570}\ a\ martorului\ tratat\ cu\ solvent) - (OD_{570}\ a\ soluției\ sărace)} \times 100$$

În mod similar, viabilitatea celulară relativă a fiecărui martor tratat cu solvent este exprimată în procente și se obține împărțind DO a fiecărui martor tratat cu solvent la DO a martorului de mediu, după scăderea valorii DO a soluției sărace din ambele valori.

27. Ar trebui să se efectueze trei repetiții independente, fiecare conținând trei godeuri replicate (și anume, n = 9). Media aritmetică a celor trei godeuri pentru fiecare substanță chimică de testat și martor tratat cu solvent, în cadrul fiecărei repetiții independente, este utilizată pentru a calcula media aritmetică a viabilității celulare relative. Media aritmetică finală a viabilității celulare este calculată pe baza celor trei repetiții independente.

28. În continuare sunt prezentate valorile-limită ale viabilității celulare pentru identificarea substanțelor chimice de testat care provoacă leziunea oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și substanțele chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU/Regulamentul CLP).

Tabelul 2

Model predictiv al metodei de testare STE

Viabilitate celulară		Clasificare în GHS al ONU/CLP	Aplicabilitate
La 5 %	La 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Neclasificată	Substanțe și amestecuri, cu excepția: i) substanțe foarte volatile, cu o presiune a vaporilor de peste 6 kPa ([1]) și ii) substanțe chimice solide (substanțe și amestecuri), cu excepția surfactanților și a amestecurilor compuse exclusiv din surfactanți
≤ 70 %	> 70 %	Nu se poate estima	Nu este cazul
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoria 1	Substanțe și amestecuri ([2])

([1]) Amestecurile care conțin substanțe cu o presiune a vaporilor mai mare de 6 kPa ar trebui evaluate cu atenție pentru a se evita posibile previziuni insuficiente, acestea trebuind să fie justificate de la caz la caz.

([2]) Pe baza rezultatelor obținute în principal cu substanțe monocomponente, deși există, de asemenea, o cantitate limitată de date privind testarea amestecurilor. Metoda de testare este totuși aplicabilă din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor multicomponente și a amestecurilor. Înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, ar trebui să se analizeze dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate furniza rezultate adecvate pentru scopul respectiv. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

▼M8

Criterii de acceptare

29. Rezultatele testului sunt considerate acceptabile în cazul în care sunt îndeplinite toate criteriile următoare:

a) Densitatea optică a martorului de mediu (expunere la mediu de cultură) ar trebui să fie de cel puțin 0,3, după scăderea densității optice a soluției sărace.

b) Viabilitatea martorului tratat cu solvent ar trebui să fie de cel puțin 80 % în raport cu martorul de mediu. În cazul în care, la fiecare repetiție, se utilizează mai mulți martori tratați cu solvent, fiecare dintre acești martori ar trebui să prezinte o viabilitate celulară mai mare de 80 % pentru a califica substanțele chimice de testat testate cu acești solvenți.

c) Viabilitatea celulară obținută cu martorul pozitiv (0,01 % SLS) ar trebui să se încadreze în două abateri standard ale mediei istorice. Limitele superioare și inferioare de acceptabilitate pentru martorul pozitiv ar trebui să fie actualizate frecvent, adică o dată la trei luni sau de fiecare dată când este efectuat un test acceptabil în laboratoare în care testele sunt desfășurate rar (și anume, mai puțin de o dată pe lună). În cazul în care un laborator nu completează un număr suficient de experimente pentru a stabili o distribuție a martorilor pozitivi solidă din punct de vedere statistic, se acceptă utilizarea limitelor superioare și inferioare de acceptare stabilite de dezvoltatorul metodei, și anume între 21,1 % și 62,3 %, în conformitate cu datele sale istorice de laborator ale acestuia, în același timp realizându-se o distribuție internă în timpul primelor teste de rutină.

d) Abaterea standard a viabilității celulare finale derivată în urma a trei repetiții independente ar trebui să fie mai mică de 15 % pentru ambele concentrații de 5 % și 0,05 % pentru substanța chimică de testat.

În cazul în care nu este îndeplinit unul sau mai multe dintre aceste criterii, rezultatele ar trebui să fie eliminate și ar trebui să se efectueze alte trei repetiții independente.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

30. Trebuis să se consemneze datele pentru fiecare godeu (de exemplu, valorile viabilității celulare) din cadrul fiecărei repetiții, precum și media globală, SD și clasificarea.

Raport testului

31. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțe chimice de testat și substanțe martor

— Substanța monocomponentă: identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Substanța multicomponentă, UVCB și amestec: caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— starea fizică, volatilitatea, pH, LogP, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

▼**M8**

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Condițiile și procedurile metodei de testare

— numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea metodei de testare utilizate;

— linia celulară utilizată, sursa sa, numărul de reînsămânțare și confluența celulelor utilizate pentru testare;

— detalii privind procedura de testare utilizată;

— numărul de repetiții și replici utilizate;

— concentrațiile substanței chimice de testat utilizate (dacă acestea diferă de cele recomandate);

— justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat;

— durata expunerii la substanța chimică de testat (dacă este diferită de cea recomandată);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

— descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— trimiterea la media martorilor pozitivi testați anterior și la abaterea standard (SD):

— Demonstrarea performanțelor de laborator în aplicarea metodei de testare (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau demonstrarea performanței reproductibile a metodei de testare în timp.

Rezultate

— Pentru fiecare substanță chimică de testat și fiecare substanță martor, precum și pentru fiecare concentrație testată, ar trebui să se prezinte sub formă de tabel valorile DO individuale pentru fiecare godeu replicat, media aritmetică a valorilor DO pentru fiecare repetiție independentă, viabilitatea celulară % pentru fiecare repetiție independentă și media aritmetică finală % a viabilității celulare și SD în cadrul celor trei repetiții;

— Rezultatele pentru mediu, solvent și martorul pozitiv care demonstrează criteriile adecvate de acceptare a studiului;

— descrierea altor efecte observate;

— clasificarea generală derivată, raportată la modelul predictiv/criteriile de decizie utilizate.

▼**M8**

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite (ONU) (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A cincea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS și Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report [nr. 48. (2)], Bruxelles, Belgia.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 34). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 263). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

Apendice

DEFINIȚII

Precizie: gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta constituie una dintre caracteristicile de performanță ale metodei de testare și unul dintre aspectele relevanței acesteia. Termenul este adesea utilizat interschimbabil cu termenul de „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (13).

Substanță de referință: o substanță utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță de referință ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) o sursă (surse) compatibilă (compatibile) și sigură (sigure); (ii) similitudini structurale și funcționale cu clasa substanțelor care sunt testate; (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date justificative privind efecte cunoscute; și (v) puterea cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordare ascendentă: abordare etapizată utilizată pentru o substanță chimică de testat susceptibilă de a nu necesita clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Iritație oculară: producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului” și cu „categoria 2 din GHS al ONU”

Rată de rezultate fals negative: proporția tuturor substanțelor chimice pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: proporția tuturor substanțelor chimice negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

Martor pentru mediu: o probă replică netratată care conține toate componentele unui sistem de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul interacționează cu sistemul de testare.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță mono-constituent: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

▼**M8**

DO: Densitate optică.

Martor pozitiv: o replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (10).

Fiabilitate: măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (13).

Sensibilitate: proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (10).

Leziune oculară gravă: producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochiului” și cu „categoria 1 din GHS al ONU”

Martor solvent/vehicul: o probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, inclusiv solventul sau vehiculul analizat împreună cu substanța chimică de testat tratată și cu alte probe martor pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată în același solvent sau vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (13).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Surfactant: numit și agent tensioactiv, aceasta este o substanță chimică, cum ar fi un detergent, care poate să reducă tensiunea la suprafață a unui lichid și, astfel, să îi permită acesteia spumarea sau penetrarea solidelor; este cunoscut, de asemenea, ca agent de umectare.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼M8

Strategie de testare etapizată: o strategie de testare pe etape în care toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt analizate, într-o anumită ordine, utilizând un proces de identificare a dovezilor în fiecare etapă pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, nu este necesară o testare suplimentară. În cazul în care potențialul iritant al unei substanțe chimice de testat nu poate fi apreciat pe baza informațiilor existente, se efectuează o procedură de testare secvențială pe animale până în momentul în care se poate realiza o clasificare lipsită de echivoc.

Abordare descendentă: o abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă leziunea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (1).

Categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP: A se vedea „iritația oculară”.

Neîncadrat în GHS al ONU/Regulamentul CLP: Substanțe chimice care nu sunt clasificate drept substanțe chimice din categoria 1 sau 2 din GHS al ONU/ Regulamentul CLP (sau în categoria 2 A sau 2B din GHS al ONU).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

▼M8

B.69. **METODA DE TESTARE PE EPITELIU SIMILAR CORNEEI UMANE RECONSTRUIT (RhCE) PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 492 (2017). *Iritația cutanată gravă* înseamnă producerea de leziuni ale țesutului ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este pe deplin reversibilă în termen de 21 de zile de la aplicare, astfel cum este definită de Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). De asemenea, conform GHS al ONU și CLP, *iritația oculară* se referă la producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Substanțele chimice de testat care provoacă leziunea oculară gravă sunt încadrate în categoria 1 din GHS al ONU și Regulamentul CLP, iar cele care provoacă iritația oculară sunt încadrate în categoria 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP. Substanțele chimice de testat care nu sunt clasificate în ceea ce privește iritația oculară sau leziunea oculară gravă sunt definite ca fiind cele care nu îndeplinesc cerințele pentru încadrarea în categoria 1 sau 2 (2A sau 2B) din GHS al ONU, și anume, cele menționate ca nefiind încadrate într-o categorie din GHS al ONU sau din Regulamentul CLP.

2. Evaluarea leziunii oculare grave/iritației oculare a implicat, de regulă, utilizarea animalelor de laborator [MT B.5 (2)]. Alegerea celei mai adecvate metode de testare și utilizarea acestei metode de testare ar trebui să fie avută în vedere în contextul documentului de orientare al OCDE referitor la o strategie integrată privind testarea și evaluarea pentru leziunea oculară gravă și iritația oculară (39).

3. Prezenta metodă de testare descrie o procedură *in vitro* care permite identificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP. Aceasta folosește epiteliu similar corneei umane (RhCE), care imită îndeaproape proprietățile histologice, morfologice, biochimice și fiziologice ale epiteliului cornean uman. Alte patru metode de testare *in vitro* au fost validate, considerate valabile din punct de vedere științific și adoptate ca fiind TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) și B.68 (6) pentru a aborda leziunea oculară gravă/iritația oculară ca punct final pentru sănătatea umană.

4. În această metodă de testare sunt incluse două teste validate care utilizează modele RhCE disponibile în comerț. Au fost efectuate studii de validare pentru evaluarea iritației oculare/leziunii oculare grave (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizând testul EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) și testul SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Fiecare dintre aceste teste utilizează structuri de țesuturi RhCE disponibile în comerț ca sistem de testare, care sunt menționate în textul de mai jos ca fiind metodele de referință validate – VRM 1 și, respectiv, VRM 2. Ca

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

urmare a acestor studii de validare și a evaluării inter pares independentă a acestora (9) (12), s-a ajuns la concluzia că EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT pot identifica în mod corect substanțe chimice (atât substanțe, cât și amestecuri) care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, în conformitate cu GHS al ONU, iar testele au fost recomandate ca fiind valabile din punct de vedere științific în acest scop (13).

5. Este general acceptat în prezent faptul că, în viitorul apropiat, nicio metodă de testare *in vitro* nu va putea înlocui în totalitate testul *in vivo* pe ochi Draize (2) (14) pentru a estima întreaga gamă de răspunsuri privind leziunea oculară gravă/iritația oculară pentru diferite clase de substanțe chimice. Însă există combinații strategice de mai multe metode de testare alternative în cadrul unor strategii de testare (etapizate), precum abordarea ascendentă/descendentă, care ar putea înlocui pe deplin testul pe ochi Draize (15). Abordarea ascendentă (15) este concepută pentru a fi utilizată atunci când, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică nu provoacă o iritație oculară suficientă pentru a impune o clasificare, iar abordarea descendentă (15) este concepută pentru a fi utilizată atunci când, pe baza informațiilor existente, se preconizează că o substanță chimică va provoca leziunea oculară gravă. Testele EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT sunt recomandate pentru a identifica substanțele chimice care nu impun clasificarea pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform GHS al ONU/Regulamentului CLP (neîncadrată într-o categorie) fără teste suplimentare, în cadrul unei strategii de testare precum abordarea ascendentă/descendentă sugerată de Scott *et al.*, de exemplu, ca o etapă inițială într-o abordare ascendentă sau ca una dintre etapele finale dintr-o abordare descendentă (15). Însă, testele EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT nu sunt prevăzute a face diferența între categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (leziunea oculară gravă) și categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (iritația oculară). Această diferențiere va trebui să fie abordată la un alt nivel al unei strategii de testare (15). O substanță chimică de testat care este identificată ca necesitând o clasificare pentru iritația oculară/leziunea oculară gravă cu EpiOcular™ EIT sau SkinEthic™ HCE EIT va presupune astfel teste suplimentare (*in vitro* și/sau *in vivo*) pentru a ajunge la o concluzie definitivă (neîncadrarea într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP, încadrarea în categoria 2 sau 1), utilizând, de exemplu, MT B.47, B.48, B.61 sau B.68.

6. Scopul acestei metode de testare este de a descrie procedura utilizată pentru a evalua potențialul de pericol pentru ochi al unei substanțe chimice de testat, pe baza capacității acesteia de a induce citotoxicitatea într-o structură de țesut RhCE, astfel cum este măsurat prin analiza MTT (16) (a se vedea punctul 21). Viabilitatea țesutului RhCE în urma expunerii la o substanță chimică de testat este determinată în comparație cu țesuturile tratate cu substanța martor negativă (viabilitate %) și este apoi utilizată pentru a prezice potențialul de pericol pentru ochi al substanței chimice de testat.

7. Standardele de performanță (17) sunt disponibile pentru a facilita validarea unor teste bazate pe RhCE *in vitro* noi sau modificate similare testelor EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT, în conformitate cu principiile din documentul de orientare nr. 34 al OCDE (18), și permit modificarea oportună a TG nr. 492 a OCDE privind includerea acestora. Acceptarea reciprocă a datelor (MAD) conform acordului OCDE va fi garantată doar pentru testele validate în conformitate cu standardele de performanță, în cazul în care respectivele teste au fost revizuite și incluse în orientarea OCDE privind testarea corespunzătoare.

DEFINIȚII

8. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

▼**M8**

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

9. Această metodă de testare se bazează pe structuri de țesut comerciale tridimensionale RhCE care sunt produse utilizând fie cheratinocite epidermice primare umane (și anume, EpiOcular™ OCL-200), fie celule epiteliale corneene umane imortalizate (și anume, SkinEthic™ HCE/S). Structurile de țesut RhCE EpiOcular™ OCL-200 și SkinEthic™ HCE/S sunt similare structurii tridimensionale a epiteliului cornean *in vivo* și sunt produse cu ajutorul celulelor din specia de interes (19) (20). În plus, testele măsoară în mod direct citotoxicitatea care rezultă ca urmare a pătrunderii substanței chimice prin cornee și a producții de leziuni la nivelul celulelor și al țesuturilor; răspunsul citotoxic determină apoi rezultatul general de leziune oculară gravă/iritație oculară *in vivo*. Leziunile celulare se pot produce prin mai multe moduri de acțiune (a se vedea punctul 20), dar citotoxicitatea joacă un rol important, dacă nu rolul mecanic principal, în determinarea răspunsului general de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice, manifestându-se *in vivo* în principal prin opacitate corneană, inflamația irisului, înroșirea conjunctivei și/sau chemoza conjunctivei, indiferent de procesele fizico-chimice care determină lezarea tisulară.

10. O gamă largă de substanțe chimice, care acoperă o varietate amplă de tipuri de substanțe chimice, clase de substanțe chimice, mase moleculare, valori LogP, structuri chimice etc., au fost testate în cadrul studiului de validare care stă la baza acestei metode de testare. Baza de date de validare EpiOcular™ EIT a cuprins în total 113 substanțe chimice din 95 de grupe funcționale organice diferite conform unui set de instrumente de analiză QSAR al OCDE (8). Majoritatea acestor substanțe chimice au reprezentat substanțe monocomponente, însă în studiu au fost incluse, de asemenea, mai multe substanțe multicomponente (inclusiv 3 homopolimeri, 5 copolimeri și 10 cvasipolimeri). În ceea ce privește starea fizică și categoriile din GHS al ONU/Regulamentul CLP, cele 113 substanțe chimice testate au fost distribuite după cum urmează: 13 lichide în categoria 1, 15 substanțe solide în categoria 1, 6 lichide în categoria 2A, 10 substanțe solide în categoria 2A, 7 lichide în categoria 2B, 7 substanțe solide în categoria 2B, 27 de lichide fără clasificare și 28 de substanțe solide fără clasificare (8). Baza de date de validare SkinEthic™ HCE EIT a cuprins în total 200 de substanțe chimice din 165 de grupe funcționale organice diferite (8) (10) (11). Majoritatea acestor substanțe chimice au reprezentat substanțe monocomponente, însă în studiu au fost incluse, de asemenea, mai multe substanțe multicomponente (inclusiv 10 polimeri). În ceea ce privește starea fizică și categoriile din GHS al ONU/Regulamentul CLP, cele 200 substanțe chimice testate au fost distribuite după cum urmează: 27 de lichide în categoria 1, 24 de substanțe solide în categoria 1, 19 lichide în categoria 2A, 10 substanțe solide în categoria 2A, 9 lichide în categoria 2B, 8 substanțe solide în categoria 2B, 50 de lichide fără clasificare și 53 de substanțe solide fără clasificare (10) (11).

11. Această metodă de testare este aplicabilă substanțelor și amestecurilor, precum și substanțelor solide, substanțelor lichide, substanțelor semisolide și cerurilor. Lichidele pot fi apoase sau neapoase; solidele pot fi solubile sau insolubile în apă. În măsura în care este posibil, solidele trebuie transformate în pulbere fină înainte de aplicare; nu este necesar alt tratament prealabil al eșantionului. Gazele și aerosolii nu au fost evaluați în cadrul unui studiu de validare. Deși se recunoaște faptul că gazele și aerosolii pot fi testați cu ajutorul tehnologiei bazate pe RhCE, actuala metodă de testare nu permite testarea produselor de acest tip.

12. Substanțele chimice de testat, care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT (în mod natural sau după tratament), și substanțele chimice de testat care pot să reducă direct colorantul MTT esențial (la formazan MTT) pot să interfereze cu măsurătorile de viabilitate tisulară și să necesite utilizarea unor martori adaptați pentru corecții. Tipul de martori adaptați care pot fi necesari vor varia în funcție de tipul de interferență produsă de substanța chimică de testat și de procedura utilizată pentru a măsura formazanul MTT (a se vedea punctele 36-42).

▼**M8**

13. Rezultatele generate în cadrul validării prealabile (21) (22) și al studiilor de validare complete (8) (10) (11) au demonstrat că atât EpiOcular™, EIT cât și SkinEthic™ HCE EIT sunt transferabile în laboratoarele considerate a avea puțină experiență în realizarea de analize și, de asemenea, sunt reproductibile în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare. Pe baza acestor studii, nivelul de reproductibilitate în ceea ce privește concordanța dintre predicțiile care pot fi așteptate în urma testului EpiOcular™ EIT pornind de la date privind 113 substanțe chimice este de ordinul a 95 % în cadrul laboratoarelor și de 93 % între laboratoare. Nivelul de reproductibilitate în ceea ce privește concordanța dintre predicțiile care pot fi așteptate în urma testului SkinEthic™ HCE EIT pornind de la date privind 120 de substanțe chimice este de ordinul a 92 % în cadrul laboratoarelor și de 95 % între laboratoare.

14. Testul EpiOcular™ EIT poate fi utilizat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Având în vedere datele obținute în cadrul studiului de validare (8), EpiOcular™ EIT are o precizie totală de 80 % (pe baza a 112 substanțe chimice), o rată de sensibilitate de 96 % (pe baza a 57 de substanțe chimice), o rată de rezultate fals negative de 4 % (pe baza a 57 de substanțe chimice), o rată de specificitate de 63 % (pe baza a 55 de substanțe chimice) și o rată de rezultate fals pozitive de 37 % (pe baza a 55 de substanțe chimice), comparativ cu datele generate de testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14) conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Un studiu în care au fost testate 97 de formule agrochimice lichide au fost testate cu EpiOcular™ EIT a demonstrat o performanță similară a metodei de testare pentru acest tip de amestecuri, astfel cum a rezultat din studiul de validare (23). Cele 97 de formule au fost distribuite după cum urmează: 21 în categoria 1, 19 în categoria 2A, 14 în categoria 2B și 43 fără încadrare, clasificate conform sistemului de clasificare GHS al ONU pe baza testului *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14). S-a obținut o precizie generală de 82 % (pe baza a 97 de formule), o sensibilitate de 91 % (pe baza a 54 de formule), o rată de rezultate fals negative de 9 % (pe baza a 54 de formule), o rată de specificitate de 72 % (pe baza a 43 de formule) și o rată de rezultate fals pozitive de 28 % (pe baza a 43 de formule) (23).

15. Testul SkinEthic™ HCE EIT poate fi utilizat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP. Având în vedere datele obținute în cadrul studiului de validare (10) (11), SkinEthic™ HCE EIT are o precizie totală de 84 % (pe baza a 200 de substanțe chimice), o rată de sensibilitate de 95 % (pe baza a 97 de substanțe chimice), o rată de rezultate fals negative de 5 % (pe baza a 97 de substanțe chimice), o rată de specificitate de 72 % (pe baza a 103 substanțe chimice) și o rată de rezultate fals pozitive de 28 % (pe baza a 103 de substanțe chimice), comparativ cu datele generate de testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14) conform sistemului de clasificare GHS al ONU/Regulamentului CLP.

16. Ratele de rezultate fals negative obținute cu ambele teste RhCE, cu substanțe sau amestecuri de substanțe, se încadrează în rata generală de probabilitate de 12 % ca substanțele chimice să fie identificate fie ca substanțe încadrate în categoria 2 din GHS al ONU și CLP, fie ca substanțe neîncadrate în nicio categorie din GHS al ONU și CLP prin testul ocular Draize *in vivo* în cadrul unor teste repetate; acest lucru se datorează viabilității inerente a metodei în cadrul testului (24). Ratele de rezultate fals pozitive obținute cu ambele metode de testare RhCE, cu substanțe sau amestecuri, nu sunt esențiale în contextul acestei metode de testare, întrucât toate substanțele chimice de testat care determină o viabilitate celulară egală cu sau mai mică decât valorile-limită stabilite (a se vedea punctul 44) vor trebui să fie supuse altor teste efectuate cu alte metode de testare *in vitro* sau, ca o ultimă opțiune, pe iepuri, în funcție de cerințele de reglementare și aplicând o strategie de testare secvențială în cadrul unei metode bazate pe dovezi. Aceste metode de testare pot fi utilizate pentru toate tipurile de substanțe chimice, iar un rezultat negativ al acestora ar trebui să fie acceptat pentru

▼M8

neclasificarea unei substanțe chimice pentru iritația oculară și leziunea oculară gravă (fără încadrare în GHS al ONU și Regulamentul CLP). Ar trebui să se consulte autoritățile de reglementare competente înainte de utilizarea EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT în cadrul altor scheme de clasificare decât GHS al ONU/Regulamentul CLP.

17. O limitare a acestei metode de testare este faptul că nu permite diferențierea între efectele iritante pentru ochi/reversibile asupra ochilor (categoria 2) și efectele de lezare oculară gravă/ireversibile asupra ochilor (categoria 1), astfel cum sunt definite în GHS al ONU și Regulamentul CLP, nici între substanțele iritante pentru ochi (categoria 2A opțională) și substanțele ușor iritante pentru ochi (categoria 2B opțională), astfel cum sunt definite în GHS al ONU (1). În acest sens, sunt necesare teste suplimentare cu alte metode de testare *in vitro*.

18. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în prezenta metodă de testare pentru a face referire la ceea ce este supus testării ([1]) și nu are legătură cu aplicabilitatea metodei de testare RhCE pentru testarea substanțelor și/sau a amestecurilor.

PRINCIPIUL TESTULUI

19. Substanța chimică de testat se aplică local pe o suprafață minimă a două structuri de țesut RhCE tridimensionale și se măsoară viabilitatea țesutului în urma expunerii și după o perioadă de incubare post-tratament. Țesuturile RhCE sunt reconstituite din cheratinocite de epidermă umană primare sau din celule epiteliale corneene umane imortalizate care au fost cultivate timp de mai multe zile pentru a forma un epiteliu scuamos stratificat și foarte diferențiat, având o morfologie similară celui din corneea umană. Structura de țesut EpiOcular™ RhCE este formată din cel puțin trei straturi viabile de celule și o suprafață necheratinizată, care prezintă o structură similară corneei, analogă celei identificate *in vivo*. Structura de țesut SkinEthic™ HCE RhCE este formată din cel puțin patru straturi viabile de celule, incluzând celule columnare bazale, celule tranziționale poliedrice și celule superficiale scuamoase, similară celei de țesut epitelial cornean uman normal (20) (26).

20. Iritația oculară gravă/iritația oculară indusă de o substanță chimică, manifestată *in vivo* în principal prin opacitate corneană, inflamația irisului, înroșirea conjunctivei și/sau chemoza conjunctivei, este rezultatul unei cascade de evenimente care încep cu pătrunderea substanței chimice prin cornee și/sau conjunctivă și producerea de leziuni la nivelul celulelor. Leziunea celulelor se poate produce prin mai multe moduri de acțiune, inclusiv: lizarea membranelor celulare (de exemplu, prin surfactanți, solvenți organici); coagularea macromoleculelor (în special a proteinelor) (de exemplu, prin surfactanți, solvenți organici, alcali și acizi); saponificarea lipidelor (de exemplu, prin alcali); și alchilarea sau alte interacțiuni covalente cu macromolecule (de exemplu, prin înălbitori, peroxizi și agenți de alchilare) (15) (27) (28). Însă, s-a demonstrat că citotoxicitatea joacă un rol important, dacă nu rolul mecanicist principal, în determinarea răspunsului general de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice, indiferent de caracteristicile fizico-chimice care stau la baza lezării țesuturilor (29) (30). Mai mult, potențialul de leziune oculară gravă/iritație oculară al unei substanțe chimice este determinat în principal de gravitatea leziunii inițiale (31), care este corelată cu gradul de moarte a celulelor (29)

([1]) În iunie 2013, reuniunea comună a OCDE a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată acum o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat” care descrie ceea ce este testat în orientările OCDE noi și actualizate privind testele.

▼M8

și cu amploarea răspunsurilor ulterioare și a eventualelor rezultate (32). Astfel, substanțele ușor iritante afectează, în general, doar epiteliul cornean superficial, substanțele ușor și moderat iritante afectează în principal epiteliul și stroma superficială, iar substanțele grav iritante deteriorează epiteliul, pătrund adânc în stromă și, uneori, în endoteliul cornean (30) (33). Măsurarea viabilității structurii țesutului RhCE după expunere topică la o substanță chimică de testat pentru a identifica substanțele chimice care nu necesită clasificare pentru leziune oculară gravă/iritație oculară (fără încadrare în GHS al ONU și Regulamentul CLP) se bazează pe ipoteza că toate substanțele chimice care provoacă leziunea oculară gravă sau iritația oculară vor induce citotoxicitate în epiteliul cornean și/sau în conjunctivă.

21. Viabilitatea tisulară RhCE se măsoară, de regulă, prin conversia enzimatică a colorantului esențial MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoliu; bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil; număr CAS 298-93-1], prin celulele viabile ale țesutului, într-o sare de formazan MTT de culoare albastră care este măsurată cantitativ după ce a fost extrasă din țesuturi (16). Substanțele chimice care nu necesită clasificare și etichetare în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP (neclasificate) sunt identificate ca fiind acelea care nu reduc viabilitatea tisulară sub un prag definit [și anume, viabilitate tisulară > 60 %, la EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EITL ([1]) sau > 50 %, la SkinEthic™ HCE EITS ([2])) (a se vedea alineatul 44).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

22. Înainte de utilizarea sistematică a testelor RhCE în scopuri de reglementare, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin estimarea corectă a celor cincisprezece substanțe chimice de verificare enumerate în tabelul 1. Aceste substanțe chimice au fost selectate dintre cele utilizate în studiile de validare a VRM (8) (10) (11). Selecția include, în măsura posibilității, substanțe chimice care: (i) prezintă diferite stări fizice; (ii) acoperă întreaga gamă de răspunsuri de leziune oculară gravă/iritație oculară *in vivo* pe baza rezultatelor de înaltă calitate obținute prin testul *in vivo* pe ochi de iepure de referință (MT B.5) (2) (14), precum și a sistemului de clasificare GHS al ONU (și anume, categoriile 1, 2A, 2B sau fără clasificare) (1) și a sistemului de clasificare CLP (și anume, categoriile 1, 2 sau fără clasificare); (iii) se referă la diferiții factori determinanți de clasificare *in vivo* (24) (25); (iv) sunt reprezentative pentru clasele de substanțe chimice utilizate în studiul de validare (8) (10) (11); (V) prezintă o rată de reprezentare bună și la nivel amplu a grupurilor funcționale ecologice (8) (10) (11); (vi) prezintă structuri chimice bine definite (8) (10) (11); (vii) sunt colorate și/sau reductori direcți ai MTT; (viii) au produs rezultate reproductibile în cadrul metodelor de testare RhCE în cursul validărilor lor; (ix) au fost corect estimate prin metodele de testare RhCE în timpul studiilor de validare a acestora; (x) acoperă întreaga gamă de răspunsuri *in vitro* pe baza datelor de înaltă calitate generate prin metodele de testare RhCE (viabilitate între 0 și 100 %); (xi) sunt disponibile în comerț; și (xii) nu sunt asociate cu costuri de achiziție și/sau eliminare prohibitive. În situațiile în care o substanță chimică menționată în listă nu este disponibilă sau nu poate fi utilizată din alte motive întemeiate, ar putea fi utilizată o altă substanță chimică care îndeplinește criteriile descrise mai sus, de exemplu, dintre substanțele chimice utilizate în procesul de validare a VRM. Însă astfel de abateri ar trebui să fie justificate.

([1]) EITL: EIT pentru substanțe lichide în cazul SkinEthic™ HCE
([2]) EITS: EIT pentru substanțe solide în cazul SkinEthic™ HCE

▼**M8**

Tabelul 1

Lista substanțelor de verificare

Denumire chimică	NR CAS	Grup organic funcțional (1)	Stare fizică	Viabilitate VRM1 (%) (2)	Viabilitate VRM2 (%) (3) Predicția VRM	Reductor MTT	Interf. culorii	Categoria 1 *in vivo* (3)
metil tioglicolat								
2365-48-2	ester acid carboxilic; tioalcool	L	10,9 ± 6,4	5,5 ± 7,4	Nu se poate estima	Y (puternic)	N	acrilat de hidroxietil
818-61-1	acrilat;	alcool	L	7,5 ± 4,7 (5)	1,6 ± 1,0	Nu se poate estima	N	N
2,5-dimetil-2,5-hexanediol	110-03-2	alcool	S	2,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	Nu se poate estima	N	N
oxalat de sodiu	62-76-0	acid oxocarboxilic	S	29,0 ± 1,2	5,3 ± 4,1	Nu se poate estima	N	N
Categoria 2A in vivo (4)								
2,4,11,13-tetraazatetradecandiimidamidă, N,N″-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-, di-D-gluconat (20 %, soluție apoasă) (6)	18472-51-0	halidă aromatică heterocilică; aril halidă; grup dihidroxil; guanidină	L	4,0 ± 1,1	1,3 ± 0,6	Nu se poate estima	N	Y (slab)
benzoat de sodiu	532-32-1	aril; acid carboxilic	S	3,5 ± 2,6	0,6 ± 0,1	Nu se poate estima	N	N
Categoria* 2B *in vivo (4)								
dietiltoluamid	134-62-3	benzamidă	L	15,6 ± 6,3	2,8 ± 0,9	Nu se poate estima	N	N
2,2-dimetil-3-metilenbiciclo [2.2.1]heptan	79-92-5	alcan, ramificat cu carbon terțiar; alchenă; biciclo-heptan; carbocicluri cu structură inelară; cicloalcan	S	4,7 ± 1,5	15,8 ± 1,1	Nu se poate estima	N	N
Fără clasificare *in vivo* (4)								
1-etil-3-sulfat de etil metilimidazoliu	342573-75-5	alcoxi; sare de amoniu; aril; imidazol; sulfat	L	79,9 ± 6,4	79,4 ± 6,2	Neclasificat	N	N

▼**M8**

Denumire chimică	NR CAS	Grup organic funcțional ([1])	Stare fizică	Viabilitate VRM1 (%) ([2])	Viabilitate VRM2 (%) ([3]) Predicția VRM	Reductor MTT	Interf. culorii	Categoria 1 *in vivo* ([3])
dicaprilil eter	629-82-3	alcoxi; Eter	L	97,8 ± 4,3	95,2 ± 3,0	Neclasificat	N	N
piperonil butoxid	51-03-6	alcoxi; benzodioxol; benzil; Eter	L	104,2 ± 4,2	96,5 ± 3,5	Neclasificat	N	N
ulei de ricin hidrogenat polietilen glicol (PEG-40)	61788-85-0	acilal; Alcool; alil; Eter	Vâscoasă	77,6 ± 5,4	89,1 ± 2,9	Neclasificat	N	N
1-(4-clorfenil)-3-(3,4-diclorfenil) uree	101-20-2	halidă aromatică heterocilică; aril halidă; derivați din uree	S	106,7 ± 5,3	101,9 ± 6,6	Neclasificat	N	N
2,2′-metilen-bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol)	103597-45-1	alcan ramificat cu carbon terțiar; carbocicluri aromatice fuzionate; heterocicluri saturate fuzionate; compuși precursori ai chinoidului; terț-butil	S	102,7 ± 13,4	97,7 ± 5,6	Neclasificat	N	N
tetrafluorborat de potasiu	14075-53-7	sare anorganică	S	88,6 ± 3,3	92,9 ± 5,1	Neclasificat	N	N

Abrevieri:

Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service; GHS al ONU = Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (1); VRM1 = metodă de referință validată, EpiOcular™ EIT; VRM2 = metodă de referință validată, SkinEthic™ HCE EIT; Interf. culorii = interferența culorii cu absorbanța standard [măsurarea densității optice (OD)] a formazanului MTT.

([1]) Grup organic funcțional încadrat conform unei analize a OCDE introduse în Toolbox 3.1 (8).

([2]) Pe baza rezultatelor obținute cu testul EpiOcular™ EIT în cadrul EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

([3]) Pe baza rezultatelor obținute cu testul SkinEthic™ HCE EIT în cadrul studiului de validare (10) (11).

([4]) Pe baza rezultatelor obținute cu testul *in vivo* pe ochi de iepure (MT B.5/OCDE TG nr. 405) (2)(14) și utilizând sistemul GHS al ONU.

([5]) Pe baza rezultatelor obținute în cadrul CEFIC CONsortium pentru studiul privind strategia de testare *in vitro* pentru iritația oculară (CON4EI).

([6]) Încadrarea în categoria 2A sau 2B depinde de interpretarea criteriului GHS al ONU pentru distingerea între cele două categorii, și anume, 1 din 3 față de 2 din 3 animale, cu efecte în ziua 7, necesar pentru a se realiza o încadrare în categoria 2A. Studiul *in vivo* a inclus trei animale. Toate punctele finale studiate, cu excepția opacității corneene la un singur animal, s-au recuperat la un punctaj de zero până în ziua 7 sau mai devreme. Singurul animal care nu s-a recuperat pe deplin în ziua 7 a avut un punctaj de opacitate corneană de 1 (în ziua 7), care s-a recuperat integral în ziua 9.

23. În cadrul verificării performanței, se recomandă ca utilizatorii să verifice proprietățile de barieră ale țesuturilor după primire, astfel cum sunt specificate de către producătorul structurii de țesut RhCE (a se vedea punctele 25, 27 și 30). Acest lucru este deosebit de important în cazul în care țesuturile sunt transportate pe distanțe/perioade îndelungate de timp. Odată ce s-a stabilit cu succes un test, iar performanța acestuia în utilizare a fost asigurată și demonstrată, nu este necesar ca astfel de verificări să fie efectuate în mod sistematic. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în mod sistematic un test, se recomandă evaluarea continuă a proprietăților de barieră la intervale regulate.

▼M8

PROCEDURA

24. Testele care sunt vizate în prezent de această metodă de testare sunt cele valabile din punct de vedere științific, EpiOcular™ EIT și SkinEthic™ HCE EIT (9) (12) (13), denumită în continuare metoda de referință validată (VRM1 și, respectiv, VRM2). Sunt disponibile proceduri standard de operare (PSO) pentru metodele de testare RhCE, care ar trebui să fie utilizate la punerea în aplicare și utilizarea metodelor de testare într-un laborator (34) (35). Punctele următoare și apendicele 2 descriu componentele și procedurile principale ale testelor RhCE.

COMPONENTELE METODEI DE TESTARE RHCE

Condiții generale

25. Ar trebui să se utilizeze celule umane relevante pentru a reconstitui țesutul epitelial tridimensional, similar corneei, care ar trebui să fie compus din celule treptat stratificate, dar nu cornificate. Structura de țesut RhCE se prepară în inserții, cu o membrană sintetică poroasă, prin care nutrienții pot trece în celule. În epiteliul reconstruit similar corneei ar trebui să existe straturi multiple de celule epiteliale viabile necheratinizate. Structura de țesut RhCE ar trebui să aibă suprafața epitelială în contact direct cu aerul, astfel încât să permită expunerea locală directă a substanțelor chimice de testat într-un mod similar modului în care ar fi expus epiteliul corneean *in vivo*. Structura țesutului RhCE ar trebui să formeze o barieră funcțională suficient de robustă pentru a rezista la pătrunderea rapidă a substanțelor de referință citotoxice, de exemplu, e.g. Triton X-100 sau dodecilsulfat de sodiu (SDS). Funcția de barieră ar trebui să fie demonstrată și poate fi evaluată prin determinarea timpului de expunere necesar pentru a reduce viabilitatea tisulară cu 50 % (ET_{50}) la aplicarea unei substanțe de referință la o concentrație specifică fixă (de exemplu, 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) sau la o concentrație la care o substanță de referință reduce viabilitatea tisulară cu 50 % (IC_{50}) în urma unui timp de expunere fix (de exemplu, un tratament de 30 de minute cu 50 µl SDS) (a se vedea punctul 30). Proprietățile de etanșeitate ale structurii de țesut RhCE ar trebui să prevină trecerea substanței chimice de testat peste marginea țesutului viabil, ceea ce ar conduce la o slabă modelare a expunerii corneene. Celulele umane utilizate pentru a stabili structura țesutului RhCE nu ar trebui să fie contaminate cu bacterii, virusuri, micoplasmă și fungi. Sterilitatea structurii țesutului ar trebui să fie verificată de furnizor pentru absența contaminării cu fungi și bacterii.

Condiții funcționale

Viabilitate

26. Analiza utilizată pentru cuantificarea viabilității tisulare este analiza MTT (16). Celulele viabile ale structurii țesutului RhCE reduc colorantul vital MTT într-un precipitat de formazan MTT de culoare albastră, care este apoi extras din țesut utilizând izopropanol (sau un solvent similar). Formazanul MTT extras poate fi cuantificat folosind fie o măsurare standard a absorbanței [densitatea optică - DO], fie o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (36). DO a solventului de extracție trebuie să fie suficient de mică, și anume DO < 0,1. Utilizatorii structurii țesutului RhCE ar trebui să se asigure de faptul că fiecare lot de structură de țesut RhCE utilizat îndeplinește criteriile stabilite pentru substanța martor negativă. Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ pentru VRM sunt date în tabelul 2. Un utilizator al spectrofotometriei HPLC/UPLC ar trebui să utilizeze intervalele DO ale martorului negativ din tabelul 2 ca și criteriu de acceptare pentru martorul negativ. Ar trebui documentat în raportul testului faptul că țesuturile tratate cu substanța martor negativă sunt stabile în cultură (prezintă măsurători ale viabilității tisulare similare) în perioada de expunere prin testare. O procedură similară ar trebui

▼M8

urmată de către producătorul țesuturilor în cadrul procedurii de eliberare a loturilor de țesuturi cu asigurarea controlului calității, dar, în acest caz, pot fi aplicate criterii de acceptare diferite de cele specificate în tabelul 2. Producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE ar trebui să stabilească un interval de acceptabilitate (limita superioară și inferioară) pentru valorile DO ale martorului negativ (în condițiile metodei de testare pentru controlul calității).

Tabelul 2

Intervalele de acceptabilitate pentru valorile DO ale martorului negativ (pentru utilizatorii testului)

Test	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (pentru protocoale privind substanțe lichide și solide)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (pentru protocoale privind substanțe lichide și solide)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Această limită de acceptabilitate are în vedere posibilitatea unui timp de livrare/păstrare prelungit (de exemplu, > 4 zile), fiind dovedit faptul că aceasta nu influențează performanța metodei de testare (37).

Funcția de barieră

27. Structura de țesut RhCE ar trebui să fie suficient de groasă și solidă pentru a rezista la pătrunderea rapidă a substanțelor de referință citotoxice, astfel cum este estimat, de exemplu, prin ET_{50} (Triton X-100) sau IC_{50} (SDS) (tabelul 3). Funcția de barieră a fiecărui lot de structură de țesut RhCE utilizat ar trebui să fie demonstrată de către producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE la momentul livrării țesuturilor la utilizatorul final (a se vedea punctul 30).

Morfologie

28. Examinarea histologică a structurii de țesut RhCE ar trebui să demonstreze faptul că aceasta este o structură de epiteliu similară corneei umane (incluzând cel puțin trei straturi de celule epiteliale viabile și o suprafață necheratinizată). Pentru VRM, morfologia corespunzătoare a fost stabilită de către producător/furnizor și, prin urmare, nu este necesar să fie demonstrată din nou de către un utilizator al metodei de testare pentru fiecare lot de țesuturi utilizat.

Reproductibilitate

29. Rezultatele martorilor pozitivi și negativi ai metodei de testare ar trebui să demonstreze reproductibilitatea în timp.

Controlul calității (CC)

30. Structura de țesut RhCE ar trebui să fie utilizată doar dacă producătorul/furnizorul demonstrează că fiecare lot de structură de țesut RhCE îndeplinește criteriile definite pentru introducere în procesul de fabricație, printre care cele mai relevante sunt criteriile privind viabilitatea (punctul 26) și funcția de barieră (punctul 27). Producătorul/furnizorul structurii de țesut ar trebui să se stabilească un interval de acceptabilitate (limite superioare și inferioare) pentru funcțiile de barieră, astfel cum este măsurat prin ET_{50} sau IC_{50} (a se vedea punctele 25 și 26). Intervalul de acceptabilitate ET_{50} și IC_{50} utilizat ca și criteriu de eliberare a lotului cu asigurarea CC de către producătorul/furnizorul structurilor de țesut RhCE (utilizate în VRM) este prezentat în tabelul 3. Datele care demonstrează conformitatea cu toate criteriile de eliberare din producție ar trebui furnizate de către producătorul/furnizorul structurii de țesut RhCE utilizatorilor metodei de testare, pentru ca aceștia să poată include aceste informații în raportul testului. Numai rezultatele obținute pentru țesuturi care îndeplinesc toate aceste criterii de eliberare din producție pot fi acceptate în vederea estimării fiabile a substanțelor chimice care nu necesită clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă în conformitate cu GHS al ONU/Regulamentul CLP.

▼M8

Tabelul 3

Criteriu de eliberare a lotului cu asigurarea CC

Test	Limita inferioară de acceptabilitate	Limita superioară de acceptabilitate
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (un tratament de 30 de minute cu 50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

31. Ar trebui să fie utilizate cel puțin două replicate de țesuturi pentru fiecare substanță chimică de testat și fiecare substanță martor din cadrul fiecărui test. Sunt utilizate două protocoale de tratament diferite, unul pentru substanțe chimice de testat lichide și unul pentru substanțe chimice de testat solide (34) (35). Pentru ambele metode și protocoale, suprafața structurii de țesut ar trebui să fie umezită cu soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco, fără calciu și fără magneziu, (DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}) înainte de aplicarea substanțelor chimice de testat, pentru a reproduce condițiile de umiditate a ochiului uman. Tratamentul aplicat țesuturilor este inițiat cu expunerea la substanța (substanțele) chimică (chimice) de testat și la substanțele martor. În cazul ambelor protocoale de tratament din ambele VRM, ar trebui să se aplice o cantitate suficientă de substanță chimică de testat sau martor pentru a acoperi uniform suprafața epitelială, evitându-se în același timp aplicarea unei doze infinite (a se vedea punctele 32 și 33) (apendicele 2).

32. Substanțele chimice de testat care pot fi introduse cu pipeta la 37 °C sau la temperaturi mai scăzute (folosind o pipetă cu piston, dacă este necesar) sunt tratate ca substanțe lichide în VRM; în caz contrar, acestea ar trebui să fie tratate ca substanțe solide (a se vedea punctul 33). În VRM, substanța chimică de testat lichidă este distribuită uniform pe suprafața țesutului (adică o aplicare minimă de 60 µl/cm^2) [a se vedea apendicele 2, (33) (34)]. Efectele capilare (efectele de tensiune la suprafață) care pot apărea din cauza volumelor mici aplicate pe locul de inserție (pe suprafața țesutului) ar trebui evitate în măsura în care este posibil pentru a garanta dozarea corectă a țesutului. Țesuturile tratate cu substanțe chimice de testat lichide se incubează timp de 30 de minute în condiții standard de cultură (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat lichidă și substanțele martor r trebui să se elimine cu grijă de pe suprafața țesutului prin spălare intensă cu DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} la temperatura camerei. Această etapă de spălare este urmată de o imersie după expunere în mediu proaspăt, la temperatura camerei (pentru a îndepărta orice substanță chimică de testat absorbită în țesut) pentru o perioadă predefinită de timp care variază în funcție de VRM utilizată. Numai în cazul VMR1 se aplică o incubare post-expunere în mediu proaspăt în condiții standard de cultură înainte de efectuarea analizei MTT [a se vedea apendicele 2, punctele (34) și (35)].

33. Substanțele chimice de testat care nu pot fi introduse cu pipeta la temperaturi de până la 37 °C sunt tratate ca substanțe solide în cadrul VRM. Cantitatea de substanță chimică de testat aplicată ar trebui să fie suficientă pentru a acoperi întreaga suprafață a țesutului, adică ar trebui să se utilizeze o aplicare de minim 60 mg/cm^2 (apendicele 2). În măsura în care este posibil, substanțele solide ar trebui să fie testate sub formă de pulbere fină. Țesuturile tratate cu substanțe chimice de testat solide sunt incubate pentru o perioadă predefinită de timp (în funcție de VRM utilizată) în condiții standard de

▼M8

cultură [a se vedea apendicele 2, (34) (35)]. La sfârșitul perioadei de expunere, substanța chimică de testat solidă și substanțele martor r trebui să se elimine cu grijă de pe suprafața țesutului prin spălare intensă cu DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} la temperatura camerei. Această etapă de spălare este urmată de o imersie după expunere în mediu proaspăt, la temperatura camerei (pentru a îndepărta orice substanță chimică de testat absorbită în țesut) pentru o perioadă predefinită de timp care variază în funcție de VRM utilizată, precum și de o incubație post-expunere în mediu proaspăt în condiții de cultură standard înainte de efectuarea analizei MTT [a se vedea apendicele 2, (34) (35)].

34. În fiecare etapă ar trebui să se includă martori negativi și pozitivi testați în paralel, pentru a demonstra că viabilitatea (determinată cu martorul negativ) și sensibilitatea (determinată prin martorul pozitiv) țesuturilor se situează în intervalele de acceptabilitate definite pe baza datelor istorice. Martorul negativ testat în paralel oferă, de asemenea, valoarea de referință (viabilitate tisulară de 100 %) pentru calcularea viabilității procentuale relative a țesuturilor tratate cu substanța chimică de testat (% $viabilitate_{test}$). Substanța martor pozitivă recomandată a fi utilizată cu metodele VRM este acetat de metil pur (nr. CAS 79-20-9, disponibil în comerț, de exemplu, de la Sigma-Aldrich, categ. nr. 45997; lichid). Substanțele martor negative recomandate pentru a fi utilizate împreună cu VRM1 și VRM2 sunt DPBS fără H_2O și fără Ca^{2+}/Mg^{2+} ultrapure. Acestea au fost substanțele de control utilizate în studiile de validare a metodelor VRM și sunt cele pentru care există cele mai multe date istorice. Utilizarea unor substanțe martor pozitive sau negative alternative adecvate ar trebui să fie justificată din punct de vedere științific și în mod adecvat. Martorii negativi și pozitivi ar trebui să fie testați cu același protocol/aceleași protocoale ca și cel(e) utilizat(e) pentru substanțele chimice de testat incluse în testare (și anume, pentru lichide și/sau solide). Această aplicare ar trebui să fie urmată de expunerea la tratament, spălare, o imersie post-expunere și o incubare post-expunere, după caz, astfel cum este descris în cazul substanțelor martor testate în paralel cu substanțele chimice de testat lichide (a se vedea punctul 32) sau, în cazul martorilor testați în paralel cu substanțele chimice de testat solide (a se vedea punctul 33), înainte de analiza MTT (a se vedea punctul 35) (34) (35). Un set unic de martori negativi și pozitivi este suficient pentru toate substanțele chimice de testat care au aceeași stare fizică (lichide sau solide) incluse în aceeași testare.

Măsurarea viabilității tisulare

35. Testul MTT este o metodă cantitativă standardizată care ar trebui să fie utilizată pentru măsurarea viabilității tisulare în cadrul prezentei metode de testare. Acesta este compatibil cu o arhitectură tridimensională a țesutului. Analiza MTT este efectuată imediat după perioada de incubație post-expunere. În VRM, proba de structură de țesut RhCE este introdusă în soluție de 0,3 ml de MTT la 1 mg/ml timp de 180 ± 15 minute în condiții standard de cultură. Colorantul esențial MTT este redus într-un precipitat de formazan albastru prin celulele viabile ale structurii de țesut RhCE. Produsul precipitat de formazan albastru MTT este apoi extras din țesut utilizând un volum corespunzător de izopropanol (sau solvent similar) (34) (35). Țesuturile testate cu substanțe chimice de testat lichide ar trebui să fie extrase atât din partea superioară, cât și din partea inferioară a țesuturilor, în timp ce țesuturile testate cu substanțe chimice de testat solide și lichide colorate ar trebui să fie extrase numai din partea inferioară a țesutului (pentru a reduce la minimum orice posibilă contaminare a soluției de extracție izopropanol cu orice substanță chimică de testat care ar fi putut rămâne pe țesut). Țesuturile testate cu substanțe chimice de testat lichide care nu sunt spălate imediat pot fi extrase numai din partea inferioară a țesutului. Substanțele martor negative pozitive testate în paralel ar trebui să fie tratate în același mod ca și substanța chimică testată. Formazanul MTT extras poate fi cuantificat fie printr-o măsurare a absorbanței standard (DO) la 570 nm, cu ajutorul unei filtru de tip band pass de maximum ± 30 nm, fie utilizând o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC (a se vedea punctul 42) (11) (36).

▼M8

36. Proprietățile optice ale substanței chimice de testat sau acțiunea sa chimică asupra MTT pot interfera cu măsurarea formazanului MTT, conducând la o estimare falsă a viabilității tisulare. Substanțele chimice de testat pot influența măsurarea formazanului MTT prin reducere directă a MTT în formazan albastru și/sau prin interferența culorii în cazul în care substanța chimică de testat absoarbe, în mod natural sau datorită procedurilor de tratament, în aceleași limite DO ca și pentru formazan MTT (și anume, 570 nm). Ar trebui să se efectueze verificări prealabile, înainte de testare, pentru a permite identificarea unor potențiali reductori direcți MTT și/sau a substanțelor chimice care influențează culoarea și ar trebui utilizați martori suplimentari pentru a detecta și a corecta posibilele interferențe din aceste acestor substanțe chimice de testat (a se vedea punctele 37-41). Acest lucru este deosebit de important atunci când o anumită substanță chimică de testat nu este îndepărtată complet din țesut prin spălare sau atunci când aceasta pătrunde în epiteliul similar corneei și, prin urmare, există în structurile de țesut RhCE atunci când este efectuată analiza MTT. În cazul substanțelor chimice de testat care absorb lumina în aceeași gamă ca și formazanul MTT (pe cale naturală sau după tratare), care nu sunt compatibile cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT ca urmare a unei interferențe prea puternice, adică o absorbție puternică la 570 ± 30 nm, poate fi utilizată o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC pentru măsurarea formazanului MTT (a se vedea punctele 41 și 42) (11) (36). O descriere detaliată a modului în care poate fi detectată și corectată direct reducerea MTT și interferențele cu ajutorul agenților de colorare este disponibilă în PSO ale VRM (34) (35) (36) (37). De asemenea, în apendicele III și IV sunt prezentate grafice de flux ilustrative care oferă indicații cu privire la modul de identificare și tratare a reductorilor MTT direcți și/sau a substanțelor chimice care influențează culoarea în cazul VRM1 și VRM2.

37. Pentru a identifica o posibilă interferență din partea substanțelor chimice de testat care absorb lumina în același interval ca și formazanul MTT (în mod natural sau după tratament) și a decide cu privire la necesitatea unor martori suplimentari, substanța chimică de testat se adaugă în apă și/sau izopropanol și se lasă la incubat pentru un timp adecvat la temperatura camerei (a se vedea apendicele 2) (34) (35). În cazul în care substanța chimică de testat din apă și/sau izopropanol absoarbe lumină suficientă în intervalul 570 ± 20 nm în cazul VRM1 (a se vedea apendicele 3) sau dacă se obține o soluție colorată atunci când se amestecă substanța chimică de testat cu apă în cazul VRM2 (a se vedea apendicele 4), se presupune că substanța chimică de testat interferează cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT și ar trebui să se obțină martori suplimentari de coloranți sau, în mod alternativ, să se utilizeze o procedură de spectrofotometrie HPLC/UPLC, caz în care nu sunt necesari acești martori (a se vedea punctele 41 și 42 și apendicele III și IV) (34) (35). La măsurarea absorbanței standard (DO), fiecare substanță chimică de testat care interferează ar trebui să fie aplicată pe cel puțin două replicate de țesut viabile, acestea fiind supuse întregii proceduri de testare, dar sunt incubate într-un mediu în locul soluției MTT în etapa de incubare a MTT pentru a genera un martor de o culoare nespecifică (NSC_{living}) (34) (35). Testul pentru martorul NSC_{living} trebuie efectuat concomitent cu testul substanței chimice de testat colorate și, în cazul testării multiple, trebuie efectuat un test pentru un martor independent NSC_{living} la fiecare test efectuat (în cadrul fiecărei secvențe de testare), din cauza variabilității biologice inerente a țesuturilor vii. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în soluția cu MTT (% $viabilitate_{test}$), minus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, testul fiind efectuat concomitent cu testul supus corectării (% NSC_{living}), și anume, viabilitate tisulară reală = [% $Viability_{test}$] - [% NSC_{living}].

38. Pentru identificarea reductorilor direcți ai MTT, ar trebui să se adauge fiecare substanță chimică de testat la o soluție de MTT proaspăt preparată. O cantitate adecvată de substanță chimică de testat se adaugă la o soluție de MTT, iar amestecul este incubat timp de aproximativ 3 ore în condiții

▼M8

standard de cultură (a se vedea apendicele III și IV) (34) (35). Dacă amestecul cu MTT care conține substanța chimică de testat (sau suspensia pentru substanțe chimice insolubile) devine albastru/violet, se presupune că substanța chimică de testat reduce direct MTT și ar trebui să se efectueze o verificare funcțională suplimentară a structurilor de țesut RhCE neviabile, independent de utilizarea măsurării standard a absorbanței (DO) sau a unei proceduri HPLC/UPLC de spectrofotometrie. Această verificare funcțională suplimentară utilizează țesuturi moarte care au doar o activitate metabolică reziduală, dar care absorb și reține substanța chimică de testat în mod similar țesuturilor viabile. Țesuturile ucise în cadrul VRM1 sunt preparate prin expunere la temperaturi scăzute (ucise prin congelare). Țesuturile ucise în cadrul VRM2 sunt preparate prin incubare prelungită (de exemplu, de cel puțin 24 ± 1 ore) în apă, urmată de o depozitare la temperatură joasă (ucise cu apă). Fiecare substanță chimică de testat care reduce MTT se aplică pe cel puțin două țesuturi moarte duplicate care sunt supuse întregii proceduri de testare pentru a genera un martor de reducere nespecifică a MTT (NSMTT) (34) (35). Un singur martor NSMTT este suficient pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste/serii de teste independente efectuate. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: viabilitatea tisulară procentuală obținută pe țesuturi vii expuse la reductorul MTT (% viabilitate$_{test}$) minus procentul de reducere a MTT nespecific obținut pe țesuturi moarte expuse la același reductor MTT, calculat în raport cu efectuarea testului pe martorul negativ, concomitent cu testul corectat (% NSMTT), și anume, viabilitate tisulară reală = [% viabilitate$_{test}$] - [% NSMTT].

39. Substanțele chimice de testat care sunt identificate ca producând atât interferența culorii (a se vedea punctul 37), cât și reducerea directă a MTT (a se vedea punctul 38) vor necesita, de asemenea, un al treilea set de martori atunci când se efectuează măsurarea absorbanței standard (DO), în afară de martorii NSMTT și NSC$_{living}$ descriși la punctele anterioare. Acest lucru este valabil, de obicei, în cazul substanțelor chimice de testat care absorb lumina în intervalul 570±30 nm (de exemplu, de culoare albastră, violet, neagră), deoarece culoarea lor intrinsecă împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce direct MTT, conform descrierii de la punctul 38. Acest lucru forțează utilizarea de martori NSMTT, în mod implicit, împreună cu martori NSC$_{living}$. Substanțele chimice de testat pentru care se produc atât martori NSMTT, cât și NSC$_{living}$, pot fi absorbite și reținute atât de țesuturile vii, cât și de cele moarte. Prin urmare, în acest caz, martorul NSMTT se poate corecta nu doar pentru o posibilă reducere directă a MTT prin substanța chimică de testat, ci și pentru interferența culorii ca urmare a aderării și reținerii substanței chimice de testat în țesuturile moarte. Aceasta ar putea conduce la o dublă corecție pentru interferența culorii, întrucât martorul NSC$_{living}$ corectează deja interferența culorii determinată de absorbția și reținerea substanței chimice de testat în țesuturile vii. Pentru a evita o posibilă corecție dublă pentru interferența culorii, ar trebui efectuat un test pentru un al treilea martor de culoare nespecifică la țesuturi moarte (NSC$_{killed}$) (a se vedea apendicele III și IV) (34) (35). La acest martor suplimentar, substanța chimică de testat se aplică pe cel puțin două țesuturi duplicate moarte, care sunt supuse întregii proceduri de testare, dar se incubează în mediu în loc de MTT în etapa de incubare MTT. O singură verificare pentru martorul NSC$_{killed}$ este suficientă pentru fiecare substanță chimică de testat, indiferent de numărul de teste independente, dar ar trebui să fie efectuată concomitent cu verificarea pentru martorul NSMTT și pe același lot de țesuturi. Viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: procentul de viabilitate tisulară obținut la țesuturile vii expuse la substanța chimică de testat (% viabilitate$_{test}$) % NSMTT minus % NSC$_{living}$ plus procentul de culoare nespecifică obținut la țesuturi moarte expuse la substanța chimică de testat care interferează și incubate în mediu fără MTT, cu calculare raportat la testul pentru martor negativ efectuat în paralel cu testul supus corectării (% NSC$_{killed}$), adică, viabilitate tisulară reală = [% viabilitate$_{test}$] - [% NSMTT] - [% NSC$_{living}$] + [% NSC$_{killed}$].

▼M8

40. Este important de remarcat faptul că reducerea MTT nespecifică și interferențele culorilor nespecifice pot crește densitatea optică (atunci când se efectuează măsurători ale absorbanței standard) a extractului de țesut peste intervalul de liniaritate a spectrofotometrului și că reducerea MTT nespecifică poate să crească, de asemenea, valoarea de vârf a formazanului MTT (atunci când sunt efectuate măsurători prin spectrometrie HPLC/UPLC) la extractul de țesut peste intervalul de liniaritate al spectrofotometrului. Pe această bază, este important ca fiecare laborator să stabilească DO/intervalul de liniaritate pentru valoarea de vârf al spectrofotometrului lor, de exemplu, cu formazan MTT (CAS nr. 57360-69-7), disponibil în comerț, de exemplu, de la Sigma-Aldrich (categ. nr. M2003) înainte de a începe testarea substanțelor chimice de testat în scopuri de reglementare.

41. Măsurarea absorbanței standard (DO) cu ajutorul unui spectrofotometru este adecvată pentru evaluarea reductorilor MTT direcți și a substanțelor chimice de testat care influențează culoarea, în cazul în care interferența constatată la măsurarea formazanului MTT nu este prea puternică (și anume, valorile OD ale extractelor de țesuturi obținute cu substanța chimică de testat fără nicio corecție pentru reducerea directă a MTT și/sau interferență a culorii se află în intervalul liniar al spectrofotometrului). Cu toate acestea, rezultatele pentru substanțele chimice de testat care produc % NSMTT și/sau % NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1 și VRM2 pentru protocolul substanțelor lichide) sau 50 % (pentru protocolul substanțelor solide) din martorul negativ ar trebui să fie tratate cu precauție, deoarece aceasta este valoarea-limită stabilită utilizată în cadrul VRM-urilor pentru a distinge substanțele chimice clasificate de cele neclasificate (a se vedea punctul 44). Însă absorbanța standard (DO) nu poate fi măsurată atunci când interferența cu măsurarea formazanului MTT este prea puternică (și anume, determinând valori ale DO necorectate ale extractelor de țesut de testare care nu se încadrează în intervalul linear al spectrofotometrului). Substanțele chimice de testat colorate sau substanțele chimice de testat care se colorează în contact cu apă sau izopropanol care interferează prea mult cu măsurarea absorbanței standard (DO) a formazanului MTT poate fi totuși evaluată cu ajutorul spectrofotometriei HPLC/UPLC (a se vedea apendicele III și IV). Aceasta se datorează faptului că sistemul HPLC/UPLC permite separarea formazanului MTT de substanța chimică înainte de cuantificarea sa (36). Din acest motiv, martorii NSC_{living} sau NSC_{killed}, nu sunt niciodată necesari atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC, independent de substanța chimică de testat. Însă ar trebui să fie utilizați martorii NSMTT în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată a reduce MTT în mod direct (în conformitate cu procedura descrisă la punctul 38). Martorii NSMTT ar trebui să fie utilizați, de asemenea, cu substanțe chimice de testat care au o culoare (intrinsecă sau care apare în apă) ce împiedică evaluarea capacității acestora de a reduce MTT în mod direct, astfel cum este descris la punctul 38. Atunci când se utilizează spectrofotometria HPLC/UPLC pentru a măsura formazanul MTT, procentul de viabilitate tisulară se calculează ca procent al formazanului MTT de vârf, care este obținut la țesuturi vii expuse la substanța chimică de testat raportat la valoarea de vârf a formazanului MTT obținută pe martorul negativ testat în paralel. În cazul substanțelor chimice de testat care pot reduce MTT în mod direct, viabilitatea tisulară reală se calculează după cum urmează: % $viabilitate_{test}$ minus % NSMTT, astfel cum este descris în ultima teză de la punctul 38. În cele din urmă, ar trebui remarcat faptul că reductorii direcți ai MTT sau reductorii direcți ai MTT care pot interfera, de asemenea, cu culorile și care sunt reținuți în țesuturi după tratament și reduc MTT atât de mult încât conduc în mod semnificativ la valori ale DO (prin măsurarea standard a DO) sau la valori de vârf (folosind spectrofotometrul UPLC/HPLC) ale extractelor de țesuturi testate care nu se încadrează în intervalul de linearitate al spectrofotometrului, nu pot fi evaluați prin metodele de testare RhCE, deși se apariția acestora este preconizată doar în situații foarte rare.

42. Spectrofotometria HPLC/UPLC poate fi utilizată, pe toate tipurile de substanțe chimice de testat (colorate, necolorate, reductori ai MTT și nereductori ai MTT) pentru măsurarea formazanului MTT (11) (36). Datorită diversității sistemelor de spectrophotometrie HPLC/UPLC, nu este fezabil pentru fiecare utilizator să stabilească exact aceleași condiții ale sistemului.

▼M8

Ca atare, calificarea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC ar trebui să fie demonstrată înainte ca acesta să fie utilizat pentru a cuantifica formazanul MTT din extractele de țesuturi prin îndeplinirea criteriilor de acceptare pentru un set de parametri standard de calificare, pe baza celor descrise în orientarea U.S. Food and Drug Administration pentru industrie cu privire la validarea metodei bioanalitice (36) (38). Acești parametri-cheie și criteriile de acceptare aferente sunt prezentate în apendicele 5. Odată ce criteriile de acceptare definite în apendicele 5 au fost îndeplinite, sistemul de spectrofotometrie prin HPLC/UPLC este considerat a fi calificat și pregătit pentru a măsura formazanul MTT în condițiile experimentale descrise în prezenta metodă de testare.

Criterii de acceptare

43. Pentru fiecare testare în care sunt utilizate loturi de țesuturi RhCE care au îndeplinit cerințele de control al calității (a se vedea punctul 30), țesuturile tratate cu substanța martor negativă ar trebui să prezinte o valoare DO care să reflecte calitatea țesuturilor în urma transportului, a etapelor de recepție și a tuturor proceselor de protocol și nu ar trebui să fie în afara limitelor stabilite în mod tradițional, care sunt descrise în tabelul 2 (a se vedea punctul 26). În mod similar, țesuturile tratate cu substanță martor pozitivă, și anume acetat de metil, ar trebui să prezinte o viabilitate tisulară medie < 50 % față de martorul negativ în cadrul VRM1, în protocoalele privind substanțele lichide sau cele solide, și ≤ 30 % (protocolul privind substanțele lichide) față de martorul negativ în cadrul VRM2, reflectând astfel capacitatea țesuturilor de a reacționa la o substanță chimică de testat iritantă în condițiile metodei de testare (34) (35). Variabilitatea între replicile de țesuturi ale substanțelor chimice de testat și cele ale substanțelor martor ar trebui să se încadreze în limitele acceptate (și anume, diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 % sau abaterea standard (SD) între trei replici de țesut nu ar trebui să depășească 18 %). În cazul în care martorul negativ sau martorul pozitiv inclus într-o testare nu se încadrează în intervalele acceptate, se consideră că testarea nu este calificată și ar trebui să fie repetată. Dacă variabilitatea dintre replicile de țesut ale unei substanțe chimice de testat se situează în afara intervalului acceptat, testul trebuie considerat a fi „necalificat”, iar substanța chimică de testat ar trebui să fie testată din nou.

Interpretarea rezultatelor și modelul predictiv

44. Valorile densității optice/de vârf obținute cu replicile de extracte de țesut pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie utilizate pentru a calcula media procentuală a viabilității tisulare (media între replicile de țesut) normalizată la martorul negativ, care este stabilită la 100 %. Valoarea-limită a viabilității tisulare procentuale pentru identificarea substanțelor chimice de testat care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă (fără clasificare conform GHS al ONU și Regulamentul CLP) este dată în tabelul 4. Rezultatele ar trebui să fie, așadar, interpretate după cum urmează:

— Substanța chimică de testat este identificată ca nefiind necesar să fie clasificată și etichetată în conformitate cu GHS al ONU și cu Regulamentul CLP (neclasificată), în cazul în care procentul mediu de viabilitate tisulară după expunere și incubația după expunere este mai mare decât (>) valoarea-limită stabilită a procentului de viabilitate tisulară, astfel cum este indicat în tabelul 4. În acest caz, nu este necesară testarea suplimentară în cadrul altor metode de testare.

▼M8

— Dacă procentul mediu de viabilitate tisulară după expunere și incubația după expunere este mai mic decât sau egal cu (≤) valoarea-limită stabilită a procentului de viabilitate tisulară, nu se poate face o estimare, astfel cum se arată în tabelul 4. În acest caz, testarea suplimentară prin alte metode de testare va fi necesară deoarece metodele de testare RhCE indică un anumit număr de rezultate fals pozitive (a se vedea punctele 14-15) și nu pot face diferența între categoriile 1 și 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP (a se vedea punctul 17).

Tabelul 4

Modele predictive conform clasificării GHS al ONU și CLP

MRV	Neclasificată	Nu se poate estima
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (pentru ambele protocoale)	Viabilitate tisulară medie > 60 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (pentru protocolul lichidelor)	Viabilitate tisulară medie > 60 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (pentru protocolul solidelor)	Viabilitate tisulară medie > 50 %	Viabilitate tisulară medie ≤ 50 %

45. Un singur test compus din cel puțin două duplicate de țesuturi ar trebui să fie suficient pentru o substanță chimică de testat atunci când rezultatul este fără echivoc. În schimb, în cazul rezultatelor ambigue, precum măsurători neconcordante ale replicilor și/sau un procent mediu de viabilitate tisulară egal cu 60 ± 5 % (VRM1 și VRM2 pentru protocolul lichidelor) sau 50 ± 5 % (VRM2 pentru protocolul solidelor), ar trebui avut în vedere un al doilea test, precum și un al treilea test în cazul unor rezultate discordante între primele două teste.

46. Pentru anumite tipuri de amestecuri ar putea fi avute în vedere valori-limită procentuale diferite pentru viabilitatea tisulară care diferențiază substanțele chimice de testat clasificate de cele neclasificate, după caz și dacă acest lucru este justificat, pentru a crește nivelul general de performanță a metodei de testare pentru respectivele tipuri de amestecuri (a se vedea punctul 14). Substanțele chimice de referință pot fi utile pentru evaluarea potențialului de leziune oculară gravă/iritație oculară al substanțelor chimice de testat necunoscute sau din clasa de produse sau pentru evaluarea potențialului de toxicitate oculară relativă al unei substanțe chimice clasificate în limitele unui anumit interval de răspunsuri pozitive.

DATE ȘI RAPORTARE

Date

47. Ar trebui să se consemneze în format tabelar, pentru fiecare substanță chimică de testat, datele fiecărei replici de țesut din cadrul unei testări (de exemplu, valorile DO/valorile de vârf ale formazanului MTT și datele procentuale calculate pentru viabilitatea tisulară pentru substanța chimică de testat și pentru substanțele martor, precum și estimarea finală a metodei de testare RhCE), inclusiv date provenind din testele repetate, după caz. În plus, ar trebui să se consemneze media procentuală de viabilitate a țesutului și diferența de viabilitate dintre două replici de țesut (dacă n = 2 replici de țesut) sau SD (dacă n ≥ 3 replici de țesut) pentru fiecare substanță chimică de testat și martor. Orice interferențe observate ale unei substanțe chimice de testat cu măsurarea formazan MTT prin reducerea directă a MTT și/sau interferența prin culoare ar trebui să fie consemnate pentru fiecare substanță chimică de testat.

Raport testului

48. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

▼**M8**

Substanța chimică de testat

Substanța monocomponentă

— identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— starea fizică, volatilitatea, pH, LogP, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— starea fizică și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

Substanțe martor pozitive și negative

— identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) de registru CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— starea fizică, volatilitatea, masa moleculară, clasa de substanțe chimice și alte proprietăți fizico-chimice relevante pentru desfășurarea studiului, în măsura în care este posibil;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— justificarea utilizării unui tip de martor negativ diferit de H2O ultrapură sau DPBS fără Ca 2+/Mg2+, dacă este cazul;

— justificarea utilizării unui martor pozitiv diferit de acetat de metil pur, dacă este cazul;

— trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi și negativi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor.

Informații referitoare la sponsor și la instalația de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu.

— *Structura de țesut RhCE și protocolul utilizat (cu justificarea alegerii lor, dacă este cazul)*

▼**M8**

Condițiile metodei de testare

— structura de țesut RhCE utilizată, inclusiv numărul de lot;

— lungimea de undă și filtrul de tip band pass (dacă este cazul) utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT, precum și intervalul de liniaritate al dispozitivului de măsurare (de exemplu, spectrofotometru);

— descrierea metodei utilizate pentru cuantificarea formazanului MTT;

— descrierea sistemului de spectrofotometrie HPLC/UPLC utilizat, dacă este cazul;

— informații de asistență complete privind structura de țesut RhE specifică utilizată, inclusiv performanța acestuia. Aceasta trebuie să includă, printre altele:

i) controlul calității pentru viabilitate (furnizor)

ii) viabilitate în condițiile metodei de testare (utilizator);

iii) controlul calității funcției de barieră;

iv) morfologia, dacă este disponibilă;

v) Reproductibilitatea și capacitatea de estimare;

vi) alte controale ale calității (CC) asupra structurii de țesut RhCE, dacă există;

— trimiteri la datele istorice ale structurii de țesut RhCE. Aceasta trebuie să includă, printre altele: acceptabilitatea datelor CC cu trimitere la datele istorice privind lotul;

— o declarație din care să reiasă că instalația de testare și-a demonstrat competența în utilizarea metodei de testare înainte de utilizarea sistematică prin testarea substanțelor chimice de verificare.

Durata și criteriile de acceptare a testului:

— valorile medii ale martorilor pozitivi și negativi și intervale de acceptare pe baza datelor istorice;

— variabilitatea acceptabilă dintre țesuturile duplicate pentru martorii pozitivi și negativi;

— variabilitatea acceptabilă dintre replicile de țesut pentru substanța chimică de testat.

Procedura de testare

— detalii cu privire la procedura de testare utilizată;

— dozele de substanțe chimice de testat și de substanțe martor utilizate;

— durata și temperatura expunerii, perioadele de imersie post-expunere și de incubație post-expunere (dacă este cazul);

— descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare;

▼M8

— indicarea martorilor utilizați pentru agenții direcți de reducere a MTT și/sau pentru substanțele testate pentru colorare, dacă este cazul;

— numărul de replici de țesut utilizate pentru fiecare substanță chimică de testat și martori (martor pozitiv, martor negativ, NSMTT, NSC_{living} și NSC_{killed}, dacă este cazul);

Rezultate

— prezentarea tabelară a datelor privind fiecare substanță chimică de testat și martor pe testări (inclusiv experimente repetate, dacă este cazul) și fiecare măsurare a replicilor, inclusiv valoarea DO sau valoarea de vârf pentru formazan MTT, procentul de viabilitate tisulară, procentul mediu de viabilitate tisulară, diferențele între replicile de țesut sau DS și estimarea finală;

— dacă este cazul, rezultatele martorilor utilizați pentru reductorii direcți ai MTT și/sau substanțele chimice colorate, inclusiv valorile de vârf ale DO sau formazanului MTT, % NSMTT, % NSC_{living}, % NSC_{killed}, diferențe între replici de țesut sau DS, procentul final corect de viabilitate tisulară și estimarea finală;

— rezultatele obținute cu substanța (substanțele) chimică(e) de testat și substanțele martor în legătură cu criteriile de acceptare ale verificării și testării specifice;

— descrierea altor efecte observate, de exemplu, colorarea țesuturilor cu o substanță chimică de testat colorată;

Discutarea rezultatelor

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, a șasea ediție revizuită, New York și Geneva: Organizația Națiunilor Unite. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Capitolul B.5 din prezenta anexă, Iritație/coroziune oculară acută.

(3) Capitolul B.47 din prezenta anexă, Metoda de testare a opacității și permeabilității corneene la bovine pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară gravă sau lezarea oculară gravă.

(4) Capitolul B.48 din prezenta anexă, Metoda de testare a ochiului izolat de pui pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare.

(5) Capitolul B.61 din prezenta anexă, Metoda de testare pentru scăpări de fluoresceină în vederea identificării substanțelor corozive și iritante grave pentru ochi.

▼**M8**

(6) Capitolul B.68 din prezenta anexă, Metoda de testare *in vitro* prin expunere pe termen scurt pentru identificarea i) substanțelor chimice care produc lezarea oculară gravă și a ii) substanțelor chimice care nu necesită clasificare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, ediție specială 2010, 261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Publicație disponibilă la adresa: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Avizul nr. 2014-03 al ESAC din 17 noiembrie 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Publicație disponibilă la adresa: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Avizul nr. 2016-02 al ESAC din 24 iunie 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Publicație disponibilă la adresa: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscris în curs de elaborare).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OCDE (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. În: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.și Maibach H.I. (editori), a patra ediție, pp. 749–815. Washington, DC, SUA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), a șaptea ediție, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, versiunea a 8-a (5 martie 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Publicație disponibilă la adresa: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, versiunea 1. (20 iulie 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Publicație disponibilă la adresa: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mai 2001. Publicație disponibilă la adresa: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment, nr. 263. ENV Publications, Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼M8

Apendicele 1

DEFINIȚII

Precizie: gradul de apropiere dintre rezultatele metodei de testare și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța metodei de testare și un aspect al „relevanței”. Termenul este adesea utilizat în paralel cu termenul de „concordanță” pentru a desemna proporția de rezultate corecte ale unei metode de testare (18).

Substanță chimică de referință: o substanță chimică utilizată în calitate de standard pentru comparația cu o substanță chimică de testat. O substanță de referință ar trebui să aibă următoarele proprietăți: (i) o sursă (surse) consecventă (consecvente) și sigură (sigure) pentru identificarea și caracterizarea sa; (ii) asemănări structurale, funcționale și/sau chimice sau la nivelul clasei de produse cu substanța (substanțele) chimică (chimice) testată (testate); (iii) caracteristici fizico-chimice cunoscute; (iv) date de susținere privind efectele cunoscute; și (v) putere cunoscută în intervalul de răspuns dorit.

Abordarea ascendentă: abordarea etapizată utilizată pentru o substanță chimică de testat susceptibilă de a nu necesita clasificare și etichetare pentru iritația oculară sau leziunea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care nu necesită clasificare și etichetare (rezultat negativ) din alte substanțe chimice (rezultat pozitiv).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Concordanță: a se vedea punctul „Precizie”.

Cornee: partea transparentă a părții frontale a globului ocular care acoperă irisul și pupila și care permite pătrunderea luminii în interior.

CV: coeficient de variație.

Dev: abatere.

EIT: test de iritație cutanată.

EURL ECVAM: Laboratorul de referință al UE pentru alternative la testarea pe animale.

Iritație oculară: producerea de modificări la nivel ocular în urma aplicării unei substanțe chimice de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care sunt complet reversibile în termen de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte reversibile asupra ochiului” și cu „categoria 2 din GHS al ONU”

ET_{50}: perioada de expunere necesară pentru a reduce viabilitatea tisulară cu 50 % la aplicarea unei substanțe chimice de referință cu o concentrație specifică fixă.

Rată de rezultate fals negative: proporția tuturor substanțelor pozitive identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind negative. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Rată de rezultate fals pozitive: proporția tuturor substanțelor negative identificate în mod fals de o metodă de testare ca fiind pozitive. Acesta este unul dintre indicatorii de performanță ai metodei de testare.

Pericol: proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

▼M8

HPLC: cromatografie lichidă de înaltă performanță.

IC_{50}: concentrație la care o substanță chimică de referință reduce viabilitatea țesutului cu 50 % ca urmare a unui timp de expunere fix (de exemplu, un tratamen tde 30 de minute cu SDS).

Doză infinită: cantitate de substanță chimică de testat aplicată pe structura de țesut RhCE care depășește cantitatea necesară pentru acoperirea completă și uniformă a suprafeței epiteliale.

Efecte ireversibile asupra ochilor: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

LLOQ: limita de cuantificare inferioară.

LogP: logaritmul coeficientului de partiționare octanol-apă

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță mono-constituent: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură de difeniltetrazoliu; Bromură de tetrazoliu, albastru de tiazolil.

Martor negativ: o probă ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că nu provoacă un răspuns pozitiv în sistemul de testare. Această probă este prelucrată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor și este utilizată pentru a determina o viabilitate tisulară de 100 %.

Neclasificat: Substanțe chimice care nu sunt clasificate pentru iritație oculară (categoria 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP, categoria 2A sau 2B din GHS al ONU) sau leziune oculară gravă (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP). Termen utilizat în paralel cu „neîncadrat într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentul CLP”.

NSC_{killed}: Culoare nespecifică la țesuturi moarte.

NSC_{living}: Culoare nespecifică la țesuturi vii.

NSMTT: Reducere nespecifică a MTT.

DO: Densitate optică.

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de testare validată, care a fost considerată a fi valabilă din punct de vedere științific, care permit evaluarea comparabilității unei metode de testare propuse similare din punct de vedere al mecanismului și din punct de vedere funcțional. Se includ: (i) componentele esențiale ale metodei de testare; (ii) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanțele acceptabile ale metodei de referință validate; și (iii) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin metoda de testare propusă la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (18).

▼M8

Martor pozitiv: o probă ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă un răspuns pozitiv în sistemul de testare. Această probă este prelucrată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu ar trebui să fie excesiv de mare.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include luarea în considerare a acurateței (conformității) unei metode de testare (18).

Fiabilitate: măsuri în care o metodă de testare poate fi reprodusă în mod reproductibil, în același laborator sau în laboratoare diferite în timp, atunci când sunt efectuate utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (18).

Test substitutiv: Un test conceput să substituie un test utilizat în mod sistematic și acceptat pentru identificarea pericolelor și/sau evaluarea riscurilor și care a fost conceput pentru a asigura o protecție echivalentă sau îmbunătățită a sănătății umane sau a animalelor sau a mediului, după caz, comparativ cu testul acceptat pentru toate situațiile de testare posibile și toate substanțele chimice (18).

Reproductibilitate: acordul dintre rezultatele obținute în urma testării repetate a aceleiași substanțe chimice de testat, utilizând același protocol de testare (a se vedea punctul „Fiabilitate”) (18).

Efecte reversibile asupra ochilor: A se vedea „iritația oculară”.

RhCE: epiteliu similar corneei umane reconstruit

Test: un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor negativ și un martor pozitiv.

SD: abatere standard.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active de testat clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (18).

▼M8

Leziune oculară gravă: producerea de leziuni tisulare la nivel ocular sau deteriorarea fizică gravă a vederii în urma aplicării unei substanțe de testat pe suprafața anterioară a ochiului, care nu este complet reversibilă într-un interval de 21 de zile de la aplicare. Termen utilizat în paralel cu „efecte ireversibile asupra ochiului” și cu „categoria 1 din GHS al ONU”.

Proceduri standard de operare (PSO): proceduri formale scrise care descriu în detaliu modul în care ar trebui să se desfășoare fiecare operațiune de laborator de rutină și specifică testelor. Acestea sunt prevăzute în GLP.

Specificitate: proporția tuturor substanțelor chimice de testat negative/inactive clasificate corect în urma testului. Acesta permite măsurarea acurateței unei metode de testare care conduce la rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unei metode de testare (18).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Test: o singură substanță chimică de testat testată concomitent pe minim două replici de țesut, astfel cum este definit în POS corespunzător.

Viabilitate tisulară: parametru care măsoară activitatea totală a unei populații celulare dintr-un țesut reconstruit ca fiind capacitatea acestora de a reduce colorantul esențial MTT, care, în funcție de punctul final măsurat și structura testului utilizat, se corelează cu numărul total și/sau vitalitatea celulelor vii.

Abordare descendentă: abordare pe etape utilizată pentru o substanță chimică susceptibilă de a provoca lezarea oculară gravă, care începe cu determinarea substanțelor chimice care provoacă lezarea oculară gravă (rezultat pozitiv) din alte substanțe chimice (rezultat negativ).

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Strategie de testare etapizată: o strategie de testare pe etape, care utilizează metode de testare în mod secvențial. Toate informațiile existente cu privire la o substanță chimică de testat sunt analizate în fiecare etapă, utilizând un proces de identificare a dovezilor pentru a determina dacă sunt disponibile suficiente informații pentru o decizie privind clasificarea pericolelor înainte de a trece la etapa următoare a strategiei. În cazul în care potențialul/puterea de pericol a unei substanțe chimice de testat poate fi apreciat(ă) pe baza informațiilor existente într-o anumită etapă, nu este necesară o testare suplimentară (18).

ULOQ: limita de cuantificare superioară.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care elaborează elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de securitate pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (1).

Categoria 1 din GHS al ONU și Regulamentul CLP: A se vedea „Leziune oculară gravă”.

Categoria 2 din GHS al ONU și Regulamentul CLP: A se vedea „iritația oculară”.

Neîncadrat în GHS al ONU și Regulamentul CLP: substanțe chimice care nu îndeplinesc cerințele pentru a fi clasificate drept substanțe din categoria 1 sau 2 din GHS al ONU/Regulamentul CLP (sau din categoria 2A sau 2B din GHS al ONU). Termen utilizat în paralel cu „neclasificat”.

UPLC: Cromatografie lichidă de performanță ultra-înaltă.

▼**M8**

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Metodă de testare valabilă: o metodă de testare considerată a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. o metodă de testare nu este niciodată valabilă într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (18).

Metodă de testare validată: o metodă de testare pentru care au fost finalizate studii de validare pentru a determina relevanța (inclusiv precizia) și fiabilitatea pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (18).

VRM: metodă de referință validată.

VRM1: testul EpiOcular™ EIT este denumit metoda de referință validată 1.

VRM2: testul SkinEthic™ EIT este denumit metoda de referință validată 2.

Identificarea dovezilor: procesul prin care se analizează punctele tari și punctele slabe ale unor informații diverse pentru a formula și a susține o concluzie în ceea ce privește potențialul de pericol al unei substanțe chimice de testat.

▼M8

Apendicele 2

COMPONENTELE PRINCIPALE ALE TESTELOR RHCE VALIDATE PENTRU IDENTIFICAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE NU NECESITĂ CLASIFICARE ȘI ETICHETARE PENTRU IRITAȚIA OCULARĂ SAU LEZIUNEA OCULARĂ GRAVĂ

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protocoale	Substanțe lichide (pot fi introduse cu pipeta la 37 ± 1 °C sau la temperaturi mai mici timp de 15 minute)	Substanțe solide (nu pot fi introduse cu pipeta)	Substanțe lichide și vâscoase (pot fi introduse cu pipeta)	Substanțe solide (nu pot fi introduse cu pipeta)
Suprafața modelelor	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Numărul de țesuturi duplicate	Cel puțin două	Cel puțin două	Cel puțin două	Cel puțin două
Pre-verificareapentru interferența culorii	50 µl + 1 ml H_2O timp de 60 de minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (substanțe chimice de testat necolorate) sau o cantitate de 50 µl + 2 ml izopropanol amestecată timp de 2-3 ore la temperatura ambiantă (substanțe chimice de testat colorate) → dacă DO a substanței chimice de testat la 570 ± 20 nm, după scăderea DO pentru izopropanol sau apă este > 0,08 (ceea ce corespunde unui procent de aproximativ 5 % din media DO a martorului negativ), ar trebui să fie obținuți martori vii adaptați.	50 mg + 1 ml H_2O timp de 60 de minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH (substanțe chimice de testat necolorate) și/sau o cantitate de 50 mg + 2 ml izopropanol amestecată timp de 2-3 ore la temperatura ambiantă (substanțe chimice de testat colorate și necolorate) → dacă DO a substanței chimice de testat la 570 ± 20 nm, după scăderea DO pentru izopropanol sau apă este > 0,08 (ceea ce corespunde unui procent de aproximativ 5 % din media DO a martorului negativ), ar trebui să fie obținuți martori vii adaptați.	o cantitate de 10 µl + 90 µl H_2O amestecată timp de 30 ± 2 minute la temperatura camerei (TC, 18-28°C) → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați	o cantitate de 10 mg + 90 µl H_2O amestecată timp de 30 ± 2 minute la TC → în cazul în care substanța chimică de testat se colorează, ar trebui să se efectueze teste pe martori vii adaptați

▼M8

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Pre-verificare pentru reducția directă a MTT	o cantitate de 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml soluție timp de 180 ± 15 minute la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare	(se utilizează 50 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ) o cantitate de 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml soluție timp de 180 ± 15 minute la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați prin congelare (se utilizează 50 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml soluție pentru 180 ± 15 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/ purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă (se utilizează 30 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)	30 mg + 300 µl MTT 1 mg/ml soluție pentru 180 ± 15 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH → în cazul în care soluția capătă o culoare albastră/ purpurie, ar trebui să fie efectueze teste pe martori adaptați eutanasiați în apă (se utilizează 30 µl de apă deionizată sterilă în soluție de MTT ca martor negativ)
Pre-tratament	20 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} timp de 30 ± 2 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, ferit de lumină.	20 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} timp de 30 ± 2 minute la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH, ferit de lumină.	—	—
Doze de tratament și aplicare	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) cu ajutorul unui instrument calibrat (de exemplu, o nivelă cu lingură calibrată pentru a ține 50 mg de clorură de sodiu).	10 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Pentru substanțele vâscoase, utilizați o plasă din nailon	30 µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Expunereincubației MTT	30 min (± 2 min) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	6 ore (± 0,25 h) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	30 min (± 2 min) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	4 ore (± 0,1 h) În mediu de cultură la 37 ± 2°C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Spălare la temperatura camerei	de trei ori în 100 ml de DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	de trei ori în 100 mlde DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+}
Imersie post-expunere	12 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură	25 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură	30 min. (± 2 min.) la 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH în mediu de cultură	30 min. (± 2 min.) la temperatura camerei în mediu de cultură

▼M8

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Incubare post-expunere	120 min. (± 15 min.) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	18 min. (± 0,25 ore) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	nu există	18 min. (± 0,5 ore) în mediu de cultură la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Martor negativ	50 µl H_2O Testat în paralel	50 µl H_2O Testat în paralel	30 ± 2µl DPBS fără Ca^{2+}/ Mg^{2+} Testat în paralel	30 ± 2µl DPBS fără Ca^{2+}/Mg^{2+} Testat în paralel
Martor pozitiv	50 µl acetat de metil Testat în paralel	50 µl acetat de metil Testat în paralel	30 ± 2µl acetat de metil Testat în paralel	30 ± 2µl acetat de metil Testat în paralel
Soluția MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
incubației MTT Timpul și temperatura	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH	180 min (± 15 min) la 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO_2, ≥ 95 % RH
Solvent de extracție	2 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat prin perforarea țesutului)	2 ml izopropanol (extracție din partea inferioară a elementului inserat prin perforarea țesutului)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea superioară și inferioară a elementului inserat)	1,5 ml izopropanol (extracție din partea inferioară a elementului inserat)
Timpul și temperatura de extracție	2-3 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau peste noapte la 4-10 °C	2-3 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau peste noapte la 4-10 °C	4 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei sau cel puțin peste noapte fără agitare la 4-10 °C	Cel puțin 2 ore cu agitare (~ 120 rpm) la temperatura camerei
Citirea DO	570 nm (550 - 590 nm) fără filtru de referință	570 nm (550-590 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință	570 nm (540 - 600 nm) fără filtru de referință
Controlul calității țesutului	Tratament cu 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tratament cu 100 µl de soluție 0,3 % (v/v) Triton X-100) 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tratament de 30 de min. cu SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Tratament de 30 de min. cu SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

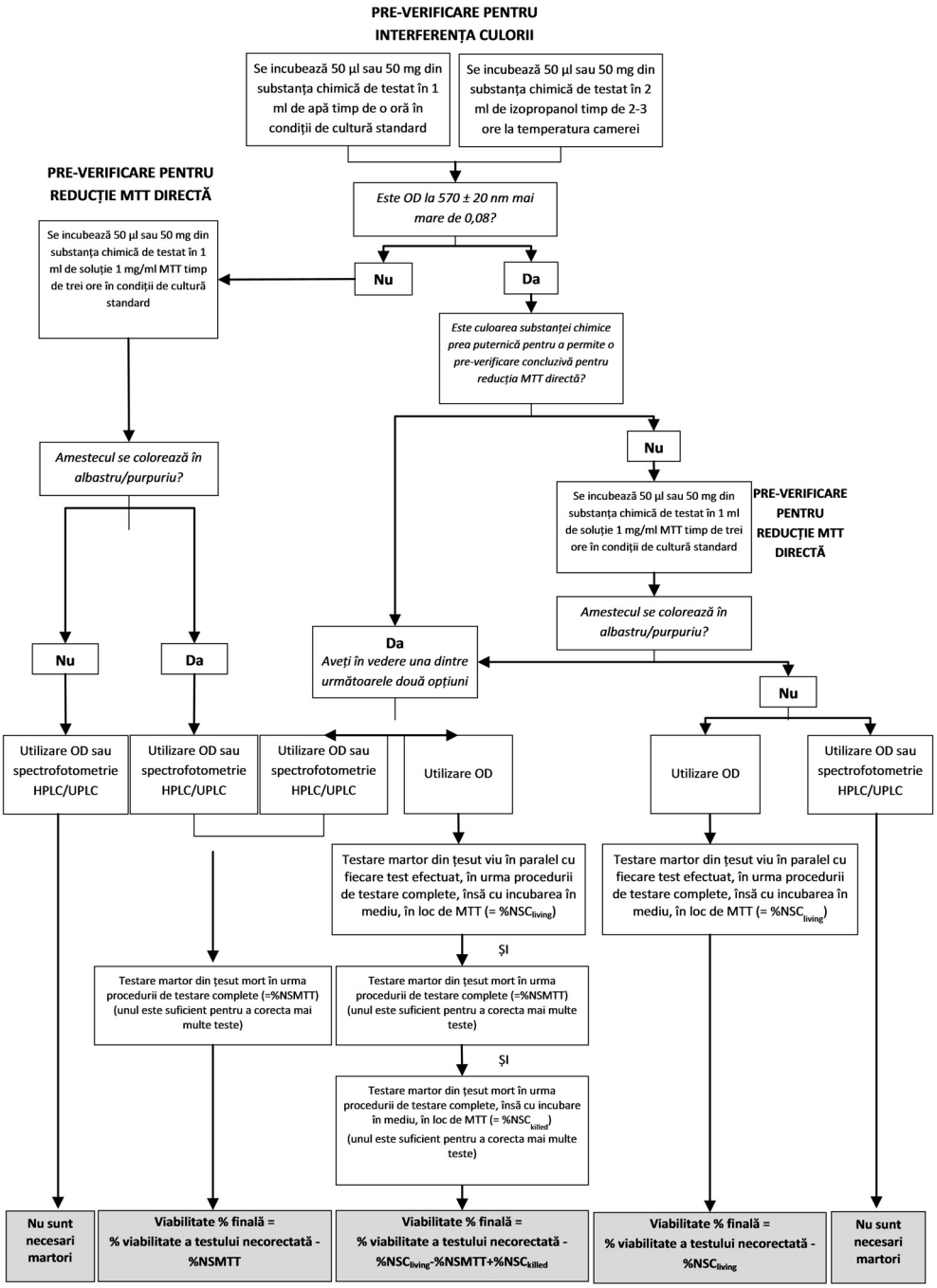
▼M8

Componentele testului	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Criterii de acceptare	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 0,8 și < 2,5 2. Viabilitatea medie a țesuturilor duplicate expuse timp de 30 de minute cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 50 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 0,8 și < 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 6 ore cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie < 50 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 1,0 și ≤ 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 30 de minute cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 30 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.	1. DO medie a replicilor de țesut tratate cu martorul negativ ar trebui să fie > 1,0 și ≤ 2,5 2. Viabilitatea medie a replicilor de țesut expuse timp de 4 ore cu martorul pozitiv, exprimată ca % din martorul negativ, ar trebui să fie ≤ 20 % 3. Diferența de viabilitate dintre două replici de țesut ar trebui să fie mai mică de 20 %.

▼M8

Apendicele 3

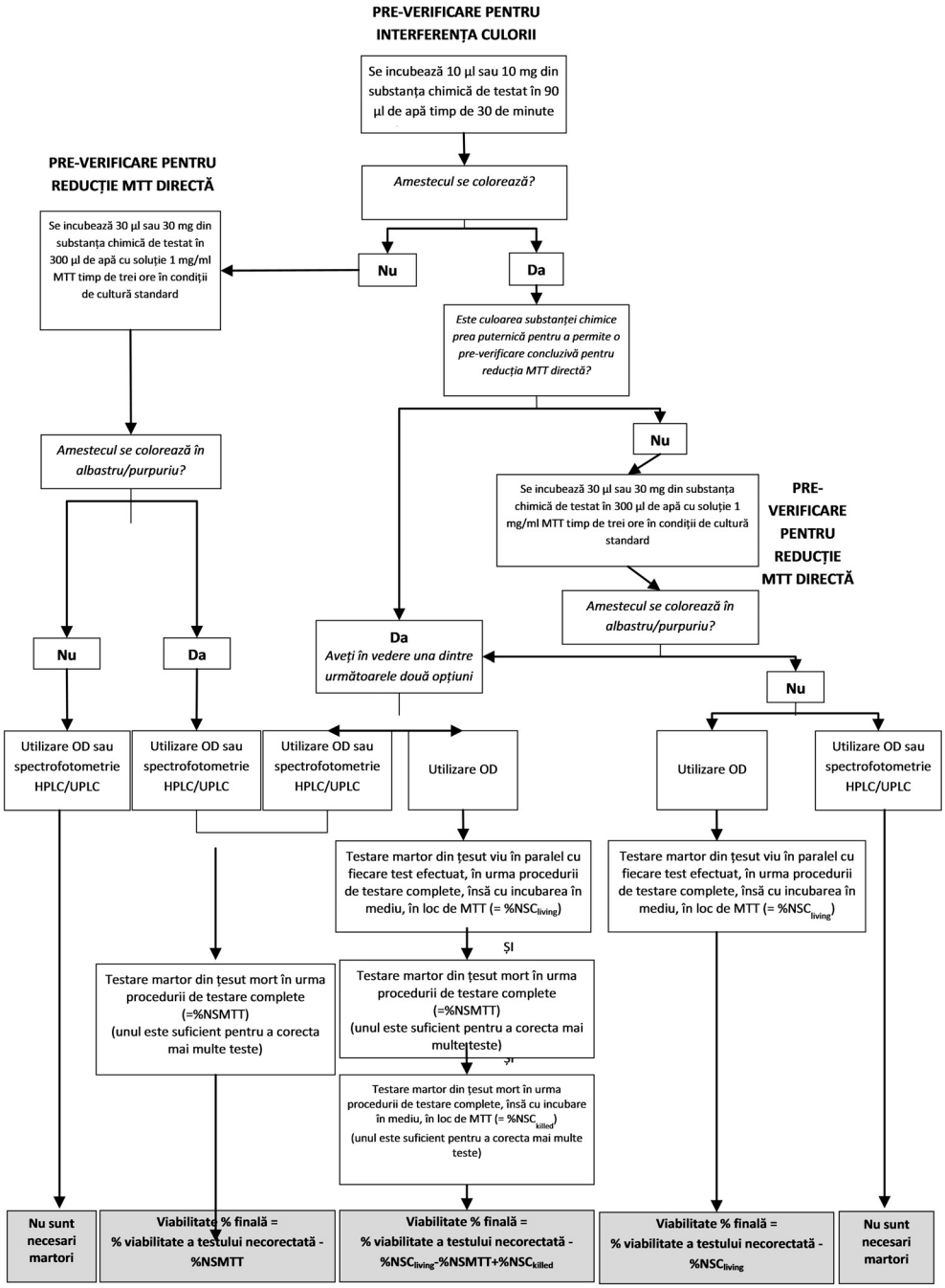
DIAGRAMĂ ILUSTRATIVĂ CARE OFERĂ ÎNDRUMĂRI PRIVIND MODUL DE IDENTIFICARE ȘI TRATARE A REDUCTORILOR MTT DIRECȚI ȘI/SAU A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE INTERFEREAZĂ PRIN CULOARE, PE BAZA PSO AFERENTE VRM1



▼**M8**

Apendicele 4

DIAGRAMĂ ILUSTRATIVĂ CARE OFERĂ ÎNDRUMĂRI PRIVIND MODUL DE IDENTIFICARE ȘI TRATARE A REDUCTORILOR MTT DIRECȚI ȘI/SAU A SUBSTANȚELOR CHIMICE CARE INTERFEREAZĂ PRIN CULOARE, PE BAZA PSO AFERENTE VRM2



▼**M8**

Apendicele 5

PARAMETRII-CHEIE ȘI CRITERIILE DE ACCEPTABILITATE PENTRU CALIFICAREA UNUI SISTEM DE SPECTROFOTOMETRIE HPLC/UPLC PENTRU MĂSURAREA FORMAZANULUI MTT EXTRAS DIN STRUCTURILE DE ȚESUT RHCE

Parametru	Protocol derivat din Orientarea FDA (36) (38)	Criterii de acceptare
Selectivitate	Analiza izopropanolului, a soluției sărace vii (extras de izopropanol din structuri de țesut RhCE vii fără tratament), a soluției sărace moarte (extras de izopropanol din structurile de țesut RhCE moarte fără tratament) și a unui colorant (de exemplu, albastru de metilen)	$Zonă_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$ ([1])
Precizie	Controale ale calității (și anume, formazan MTT la 1,6 µg/ml, 16 µg/ml și 160 µg/ml) în izopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Precizie	Controlul calității la izopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ
Efectul de matrice	Controlul calității la proba vie (n = 5)	85 % ≤ % efect de matrice ≤ 115 %
Reportare	Analiza izopropanolului conform unui standard ULOQ ([2])	$Zona_{interferență} \leq 20$ % din $Zona_{LLOQ}$
Reproductibilitate (în aceeași zi)	3 curbe de calibrare independente (pe baza a 6 diluții 1/3 consecutive de formazan MTT în izopropanol începând de la valoarea ULOQ, și anume, 200 µg/ml); Controlul calității la izopropanol (n = 5)	Curbe de calibrare: % Dev ≤ 15 % sau ≤ 20 % pentru LLOQ Controale ale calității: % Dev ≤ 15 % și CV ≤ 15 %
Reproductibilitate (între zile diferite)	Ziua 1: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 2: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3) Ziua 3: 1 curbă de calibrare și controalele ale calității în izopropanol (n = 3)	
Stabilitate pe termen scurt a formazanului MTT în extractul de țesut RhCE	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după 24 de ore de la stocare la temperatura camerei	% Dev ≤ 15 %
Stabilitate pe termen lung a formazanului MTT în extractul de țesut RhCE, dacă este necesar	Controalele calității pe proba vie (n = 3) sunt analizate în ziua preparării și după mai multe zile de stocare la -20°C	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limita inferioară de cuantificare, definită ca acoperind 1-2 % din viabilitatea tisulară, și anume, 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Limita superioară de cuantificare, definită ca fiind de cel puțin două ori mai mare decât cea mai mare concentrație prevăzută de formazan MTT în extracte de izopropanol din martori negativi (~70 µg/ml la VRM), și anume 200 µg/ml.

▼M8

B.70. ANALIZE *IN VITRO* CU RECEPTOR DE ESTROGEN RECOMBINANT UMAN (hrER) PENTRU DETECTAREA SUBSTANȚELOR CHIMICE CU AFINITATE DE LEGARE DE ER

INTRODUCERE GENERALĂ

Orientarea OCDE privind testarea pe baza performanței

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 493 (2015). TG nr. 493 este o orientare privind testarea bazată pe performanță (PBTG), în care este descrisă metodologia pentru analizele *in vitro* asupra recombinantului uman pentru detectarea substanțelor cu afinitate de legare de receptorul de estrogen (analize de legare hrER). Aceasta cuprinde două analize similare din punct de vedere mecanicist și funcțional pentru identificarea agenților de legare de receptorii de estrogen (și anume, ERα) și ar trebui să faciliteze dezvoltarea unor analize similare noi sau modificate în conformitate cu principiile de validare prevăzute în documentul de orientare al OCDE privind validarea și acceptarea internațională a metode de testare noi și actualizate pentru evaluarea riscurilor (1). Metodele de testare de referință validate integral (apendicele 2 și 3), care servesc drept bază pentru această PBTG, sunt:

— Analiza legării receptorului de estrogen (ER) *in vitro* Freyberger-Wilson (FW) care utilizează un recombinant uman de lungime completă ERα (2) și

— analiza legării receptorului de estrogen *in vitro* a Institutului de Evaluare și Cercetare în Chimie (Chemical Evaluation and Research Institute - CERI) care utilizează o proteină din domeniul de legare prin ligand recombinant uman (2).

Există standarde de performanță (SP) (3) pentru a facilita elaborarea și validarea unor metode de testare similare pentru același punct final de pericol și pentru a permite modificarea oportună a PBTG nr. 493 pentru a se putea adăuga analize similare unei PBTG actualizate. Însă analizele de testare similare vor fi adăugate doar după revizuirea și confirmarea de către OCDE a respectării standardelor de performanță. Testele incluse în TG nr. 493 pot fi utilizate fără nicio deosebire pentru a răspunde cerințelor statelor membre ale OCDE pentru rezultatele testelor privind legarea de receptori de estrogen, beneficiind în același timp de sistemul de acceptare reciprocă a datelor al OCDE.

Context și principii ale testelor incluse prezenta metodă de testare

2. În 1998, OCDE a inițiat o activitate cu un nivel ridicat de prioritate pentru a revizui orientările existente privind testarea și a elabora noi orientări pentru depistarea și testarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin. Cadrul conceptual al OCDE (CC) pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice cu potențial de perturbare a sistemului endocrin a fost revizuit în 2012. Cadrele conceptuale inițiale și revizuite sunt incluse ca anexe la documentul de orientare al privind orientările de testare standardizate pentru evaluarea substanțelor chimice în vederea identificării perturbatorilor endocrini (4). CC cuprinde cinci niveluri, fiecare nivel corespunzând unui nivel diferit de complexitate biologică. Testele de legare de ER descrise în această metodă de testare sunt de nivelul 2, care include „*teste in vitro care furnizează date cu privire la (un) anumit(e) mecanism(e)/o cale endocrină/anumite căi endocrine*.” Această metodă de testare este utilizată pentru analizele privind legarea de receptor *in vitro*, prevăzute a identifica liganzii pentru receptorul de estrogen uman alfa (ERα).

▼**M8**

3. A fost demonstrată în mod clar relevanța analizei de legare de ER *in vitro* pentru funcțiile biologice. Analizele de legare de ER sunt concepute pentru a identifica substanțele chimice care au potențialul de a perturba calea hormonilor estrogeni și au fost utilizate pe scară largă în ultimele două decenii pentru a caracteriza distribuția țesuturilor ER, precum și pentru a identifica agoniști/antagoniști ai ER. Aceste analize reflectă interacțiunea dintre receptori și liganzi care este treapta inițială a căii de semnalizare estrogenică și esențială pentru funcția de reproducere la toate vertebratele.

4. Interacțiunea estrogenilor cu ER poate să afecteze transcrierea genelor controlate de estrogen și să inducă efecte non-genomice, ceea ce poate conduce la inducerea sau inhibarea proceselor celulare, inclusiv a celor necesare pentru proliferare celulară, dezvoltare normală a fătului și funcția de reproducere (5) (6) (7). Perturbarea sistemelor estrogenice normale poate avea potențialul de a declanșa efecte adverse asupra dezvoltării normale (ontogeneză), a sănătății reproductive și a integrității sistemului de reproducere. Semnalizarea ER inadecvată poate conduce la efecte cum ar fi un risc crescut de cancer hormono-dependent, afectarea fertilității și modificări ale creșterii și dezvoltării fetale (8).

5. Analizele *in vitro* de legare se bazează pe o interacțiune directă a unei substanțe cu un anumit loc de legare a receptorului de ligand care reglează transcrierea genei. Componenta esențială a analizei de legare de receptorul de estrogen recombinant uman alpha (hrERα) măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([^{3}H]17-β-estradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand și pentru documentarea specificității ER, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

6. Studiile de validare a analizelor de legare CERI și FW și-au demonstrat relevanța și fiabilitatea acestora pentru scopul prevăzut (2).

7. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta metodă de testare sunt descrise în apendicele 1.

Domeniul de aplicare și limitările aferente analizelor de legare de receptori

8. Aceste teste sunt propuse pentru depistare și stabilirea priorităților, dar pot furniza, de asemenea, informații pentru un eveniment de inițiere moleculară (MIE) care poate fi utilizat în cadrul unei abordări bazate pe dovezi. Acestea abordează legarea chimică de domeniul de legare a ligandului ERα în cadrul unui sistem *in vitro*. Astfel, rezultatele nu ar trebui să fie extrapolate în mod direct cu semnalizarea și reglarea complexă a sistemului endocrin *in vivo*.

▼**M8**

9. Legarea ligandului natural, 17β-estradiol, reprezintă prima etapă a unei serii de evenimente moleculare care activează transcrierea genelor țintă și, în cele din urmă, culminează cu o modificare fiziologică (9). Astfel legarea de domeniul de legare a ligandului de ERα este considerată drept unul dintre principalele mecanisme ale perturbării endocrine mediate de ER (ED), deși există și alte mecanisme prin care pot apărea ED, inclusiv interacțiunile cu (i) locuri ale ERα, altele decât cavitatea de legare a liganzilor, (ii) interacțiuni cu alți receptorii relevanți pentru semnalizarea estrogenului, receptorul de estrogen cuplat cu proteina G și ERβ, alți receptori și sisteme enzimatice din sistemul endocrin, (iii) sinteza hormonilor, (iv) activarea metabolică și/sau inactivarea hormonilor, (v) distribuția hormonilor către țesuturile țintă și (vi) eliminarea hormonilor din organism. Niciuna dintre analizele efectuate în cadrul acestei metode de testare nu abordează aceste moduri de acțiune.

10. Această metodă de testare abordează capacitatea substanțelor de a se lega de ERα uman și nu face distincție între agoniști sau antagoniști ai ERα. Aceste analize nu abordează nici alte evenimente din aval precum transcrierea genelor, nici modificările fiziologice. Având în vedere că, în timpul validării, au fost utilizate numai substanțe monocomponente unice, aplicabilitatea pentru amestecuri de testare nu a fost abordată. Cu toate acestea, analizele sunt aplicabile teoretic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente. Înainte de utilizarea metodei de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare prevăzut, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate pentru respectivul scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

11. Sistemele cu receptor fără celule nu au o capacitate metabolică intrinsecă și nu au fost validate în combinație cu sisteme enzimatice metabolice. Cu toate acestea, ar putea fi posibil să se integreze activitatea metabolică într-un proiect de studiu, dar acest lucru ar necesita eforturi suplimentare de validare.

12. Substanțele chimice care pot denatura proteina (și anume, proteina receptoare), cum ar fi surfactantul sau substanțele chimice care pot schimba pH-ul soluției tampon a analizei, nu pot fi testate sau pot fi testate doar în concentrații lipsite de astfel de interacțiuni. În caz contrar, intervalul de concentrație care poate fi testat în cadrul analizelor pentru o substanță chimică de testat este limitat de solubilitatea acesteia în soluția tampon a analizei.

13. În scop informativ, tabelul 1 prezintă rezultatele testului pentru cele 24 de substanțe care au fost testate în cadrul ambelor analize validate complet descrise în prezenta metodă de testare. Dintre aceste substanțe, 17 sunt clasificate ca fiind lianți de ER și 6 ca fiind non-lianți pe baza rapoartelor publicate, inclusiv a analizelor *in vitro* pentru activarea transcripțională a ER și sau a analizei uterotropice (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). În ceea ce privește datele sintetizate în tabelul 1, s-a ajuns la un acord de aproape 100 % între cele două analize privind clasificările tuturor substanțelor, până la 10^{-4}M, și fiecare substanță a fost clasificată în mod corect ca fiind liant/non-liant de ER. Informații suplimentare privind acest grup de substanțe, precum și alte substanțe testate în cadrul analizelor de legare de ER în timpul studiilor de validare sunt prezentate în standardele de performanță pentru hrER (3), apendicele 2 (tabelele 1, 2 și 3).

▼M8

Tabelul 1

Clasificarea substanțelor ca lianți sau non-lianți de ER la testarea în cadrul analizelor FW și CERI hrER, comparativ cu răspunsul preconizat

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
1	17β-Estradiol	50-28-2	*Liant*	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
2	Noretinodrel	68-23-5	*Liant*	3×10^{-9}-30×10^{-4}	Liant	3×10^{-9}-30×10^{-4}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
3	Noretindronă	68-22-4	*Liant*	3×10^{-9}-30×10^{-4}	Liant	3×10^{-9}-30×10^{-4}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
4	Ftalat de di-*n*-butil	84-74-2	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant (**) (+)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant (**) (+)	Hidrocarbură (ciclică), ester	Plastifiant, substanță chimică intermediară
5	DES	56-53-1	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
6	17α-etinilestradiol	57-63-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Steroid	Produs farmaceutic, agent veterinar
7	Mezo-hexestrol	84-16-2	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Produs farmaceutic, agent veterinar
8	Genisteină	446-72-0	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (heterociclică), flavonoid	Produs natural

▼M8

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
9	Ecvol	531-95-3	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Metabolit fitoestrogen	Produs natural
10	Butilparaben (*n* 4-hidroxibenzoat de butil)	94-26-8	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Paraben	Conservant
11	Nonilfenol (amestec)	84852-15-3	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Alchilfenol	Compus intermediar
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Organoclorură	Insecticid
13	Corticosteron	50-22-6	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Steroid	Produs natural
14	Zearalenonă	17924-92-4	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (heterociclică), lactonă	Produs natural
15	Tamoxifen	10540-29-1	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură, (ciclică)	Produs farmaceutic, agent veterinar
16	5α-dihidrotestosteron	521-18-6	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Steroid, nonfenolic	Produs natural
17	Bisfenol A	80-05-7	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Fenol	Substanță chimică intermediară
18	4-*n*-heptilfenol	1987-50-4	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Echivoc ([a])	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Alchilfenol	Intermediar

▼M8

	Denumirea substanței	NR. CAS	Răspuns preconizat	Analiza FW		Analiza CERI		Substanță chimică MESH Clasă	Clasa de produse
				Interval de concentrații (M)	Clasificare	Interval de concentrații (M)	Clasificare		
19	Kepone (clordeconă)	143-50-0	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Hidrocarbură (halogenat)	Pesticid
20	Benzo(a)antracen	56-55-3	*Non-liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant (b)	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant (b)	Hidrocarbură aromatică	Intermediar
21	Enterolactonă	78473-71-9	*Liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Liant	Fitoestrogen	Produs natural
22	Progesteron	57-83-0	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Steroid	Produs natural
23	Octiltrietoxisilan	2943-75-1	*Non-liant*	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Non-liant	Silan	Modificator de suprafață
24	Atrazină	1912-24-9	*Non-liant* (*)	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Non-liant	Compus heterociclic	Erbicid

(*) Limită de solubilitate < 1×10^{-4}M.

(**) Utilizarea și clasificarea substanței ftalat de di-n-butil (DBP) ca non-liant au fost bazate pe testarea până la 10^{-4} M, deoarece s-a observat că substanța este insolubilă la 10^{-3}M (de exemplu, turbiditate) în unele laboratoare în timpul studiilor de pre-validare.

(+) În timpul studiului de validare, ftalatul de di-*n*-butil (DBP) a fost testat ca o substanță de testat codificată la concentrații de maxim 10^{-3}M. În aceste condiții, unele laboratoare au observat o scădere a legării radioactive a ligandului la cea mai mare concentrație (10^{-3}M) și/sau o curbă ambiguă. Pentru aceste teste, DBP a fost clasificat drept „echivoc" sau „liant" în 3/5 laboratoare care utilizează analiza CERI și în 5/6 laboratoare care utilizează analiza FW [a se vedea referința (2), secțiunile IV.B.3a, b și VI.A].

(a) Clasificarea nu a fost în concordanță cu clasificarea preconizată. Clasificarea substanței 4-*n*-heptilfenol ca fiind „echivocă" sau „non-liant" de 3/5 laboratoare a avut drept rezultat o clasificare medie ca substanță echivocă. O inspecție mai atentă a arătat că acest lucru s-a datorat limitărilor privind solubilitatea substanței chimice, care au împiedicat producerea unei curbe de legare complete.

(b) În cursul studiului de validare, substanța benzo(a)antracen a fost reclasificată ca non-liant (și anume, negativă) pe baza literaturii de specialitate publicate care demonstrează că o activitate estrogenă *in vitro* raportată pentru această substanță (16) este în principal dependentă de activarea sa metabolică(17)(18). Activarea metabolică enzimatică a substanței nu ar fi anticipată în cadrul analizelor de legare de hrER fără celule, astfel cum este utilizată în acest studiu de validare interlaboratoare. Astfel, această substanță este clasificată în mod corect ca fiind un „non-liant" atunci când este utilizată în condițiile experimentale pentru analizele FW și CERI.

▼M8

COMPONENTELE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER

Componentele esențiale ale testului

14. Această metodă de testare se aplică pentru analizele care utilizează un receptor ER și un ligand suficient de puternic de receptor, care poate fi utilizat ca marker/detector pentru analiză și poate fi desprins la concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. Analizele de legare conțin următoarele două componente principale: 1) legarea prin saturație și 2) legarea competitivă. Analiza legării prin saturație este utilizată pentru a confirma specificitatea și activitatea preparatelor cu receptor, în timp ce experimentul de legare competitivă este utilizat pentru a evalua capacitatea unei substanțe chimice de testat de a se lega de hrER.

Martori

15. Ar trebui să se descrie baza pentru estrogenul de referință propus a fi testat în paralel și martorii. Martorii testați în paralel [tratați cu solvent (vehicul), pozitivi (liant de ER; afinitate puternică și slabă), negativi (non-liant)], după caz, servesc drept indicatori pentru operativitatea testului în condițiile de testare și furnizează o bază pentru comparații între experimente; acestea fac parte, de obicei, din criteriile de acceptabilitate pentru un anumit experiment) (1). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și non-liant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină: 1) o concentrație ridicată (aproximativ desfacerea totală a ligandului marcat radioactiv) și o concentrație medie (aproximativ IC_{50}) fiecare de liant E2 și slab în trei replici; 2) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în trei replici.

Proceduri standard de control al calității

16. Ar trebui să fie desfășurate proceduri standard de control al calității, astfel cum sunt descrise pentru fiecare analiză pentru a asigura faptul că receptorii activi, concentrațiile chimice corecte și limitele de toleranță rămân stabile pe parcursul unor replici multiple și că își păstrează capacitatea de a asigura răspunsurile de legare de ER preconizate în timp.

Demonstrarea competenței laboratorului

17. Înainte de a testa substanțele chimice necunoscute prin oricare dintre analizele din cadrul acestei metode de testare, fiecare laborator ar trebui să își demonstreze competența în utilizarea analizei prin efectuarea de analize de saturație pentru a confirma specificitatea și activitatea preparatului cu ER, precum și analize de legare competitivă cu estrogenul de referință și martori (liant slab și non-liant). Laboratorul ar trebui să dezvolte o bază de date istorice cu rezultate pentru estrogenul de referință și martori, care au fost generate în urma a 3-5 experimente independente desfășurate în zile diferite. Aceste experimente vor constitui baza pentru estrogenul de referință și martorii testați anterior pentru laborator și vor fi utilizate ca evaluare parțială a acceptabilității analizei în testele viitoare.

18. Capacitatea de răspuns a sistemului de testare va fi, de asemenea, confirmată prin testarea substanțelor de verificare enumerate în tabelul 2. Lista substanțelor de verificare constituie un subset al substanțelor de referință prevăzute în standardele de performanță pentru analizele de legare de ER (3). Aceste substanțe sunt disponibile în comerț, reprezintă clasele de substanțe chimice asociate în mod obișnuit cu activitatea de legare de ER, prezintă un interval adecvat de putere preconizată pentru lianții de ER (și anume, puternice sau slabe) și non-lianți (și anume, negative). Pentru fiecare substanță de verificare, concentrațiile testate ar trebui să acopere intervalul indicat în tabelul 2. Ar trebui să fie efectuate cel puțin trei experimente pentru fiecare substanță, iar rezultatele ar trebui să fie în concordanță cu activitatea chimică preconizată. Fiecare experiment ar trebui să fie desfășurat în mod independent (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactiv), cu câte trei replici pentru fiecare concentrație. Performanța este demonstrată prin clasificarea corectă (pozitiv/negativ) a fiecărei substanțe de verificare. Competența ar trebui să fie testată de către fiecare tehnician atunci când învață analizele.

▼M8

Tabelul 2

Lista martorilor și a substanțelor de verificare pentru analizele de legare competitivă de hrER ([1])

Nr.	Denumirea substanței	Nr. CAS ([2])	Răspuns preconizat ([3]) ([4])	Interval de concentrații de testare (M)	Clasa de substanțe chimice MeSH ([5])	Clasă de produse ([6])
			Martori (estrogen de referință, liant slab, non-liant)			
1	17-εστραδιολ	50-28-2	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
2	Noretinodrel (sau) Noretindronă	68-23-5 (sau) 68-22-4	Liant	3×10^{-9}-30×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
3	Octiltrietoxisilan	2943-75-1	Non-liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Silan	Modificator de suprafață
			Substanțe de verificare ([6])			
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Farmaceutic, agent veterinar
5	17α-etinilestradiol	57-63-6	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Steroid	Farmaceutic, agent veterinar
6	Mezo-hexestrol	84-16-2	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică), fenol	Farmaceutic, agent veterinar
7	Tamoxifen	10540-29-1	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Hidrocarbură (ciclică)	Farmaceutic, agent veterinar
8	Genisteină	446-72-0	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Compus heterociclic, flavonoid,	Produs natural
9	Bisfenol A	80-05-7	Liant	1×10^{-10}-1×10^{-3}	Fenol	Substanță chimică intermediară
10	Zaralonionă	17924-92-4	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-3}	Compus heterociclic, lactonă	Produs natural

▼M8

Nr.	Denumirea substanței	Nr. CAS ([2])	Răspuns preconizat ([3]) ([4])	Interval de concentrații de testare (M)	Clasa de substanțe chimice MeSH ([5])	Clasă de produse ([6])
11	Butilparaben	94-26-8	Liant	1×10^{-11}-1×10^{-3}	Acid carboxilic, fenol	Conservant
12	Atrazină	1912-24-9	Non-liant	1×10^{-11}-1×10^{-6}	Compus heterociclic	Erbicid
13	Ftalat de di-n-butil (DBP) ([7])	84-74-2	Non-liant ([8])	1×10^{-10}-1×10^{-4}	Hidrocarbură (ciclică), ester	Plastifiant, substanță chimică intermediară
14	Corticosteron	50-22-6	Non-liant	1×10^{-11}-1×10^{-4}	Steroid	Produs natural

([1]) Dacă o substanță de verificare nu mai este disponibilă în comerț, poate fi utilizată o substanță cu aceeași clasificare de legare de ER, având o putere comparabilă și fiind din aceeași clasă de substanțe chimice.
([2]) Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service.
([3]) Clasificare ca liant de ERααsau non-liant în timpul studiului de validare pentru analizele de legare de hrER CERI și FW (2).
([4]) Activitatea de legare de ER s-a bazat pe documentele ICCVAM de trecere în revistă a cadrului general (BRD) pentru testele de legare de ER și TA (9), precum și pe datele empirice și pe alte informații obținute din studii de referință publicate și revizuite (10) (11) (12) (13) (14) (15).
([5]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de substanțe chimice folosind titlurile din vocabularul Medical Subject Headings (MeSH) al National Library of Medicine din Statele Unite, o schemă de clasificare standardizată recunoscută la nivel internațional (material disponibil la adresa: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
([6]) Substanțele au fost încadrate într-una sau mai multe clase de produse pe baza datelor din Banca de date despre substanțe periculoase (Hazardous Substances Database) a National Library of Medicine din Statele Unite (material)
([7]) DBP poate fi utilizat ca non-liant martor alternativ testat cu o concentrație maximă de 10^{-4} M.
([8]) Limita de solubilitate pentru această substanță este 10^{-4} M. Utilizarea și clasificarea substanței ftalat de di-n-butil (DBP) ca non-liant au fost bazate pe testarea până la 10^{-4} M, deoarece s-a observat că substanța este insolubilă la 10^{-3}M (de exemplu, turbiditate) în unele laboratoare în timpul studiilor de pre-validare.

▼M8

Teste de solubilitate și identificarea intervalului de concentrații pentru substanțele chimice de testat

19. Ar trebui efectuat un test preliminar pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea testului. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul. Concentrațiile din cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns.

Criteriile de acceptabilitate a unui test

20. Acceptarea sau respingerea unui test se bazează pe evaluarea rezultatelor obținute pentru estrogenul și martorul de referință utilizați pentru fiecare experiment. În primul rând, pentru placa 1, curbele complete de concentrații pentru martorii de referință, în cadrul fiecărui experiment, ar trebui să fie în concordanță cu valorile de măsurare ale performanței cu parametrii de formare a curbei (de exemplu, IC_{50} și Hillslope) pe baza rezultatelor raportate pentru protocoalele respective pentru analizele CERI și FW (apendicele 2 și 3) și a datelor privind martorii testați anterior din laboratorul care efectuează testul. Toți martorii (estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul) ar trebui să fie clasificați în mod corect pentru fiecare experiment. În al doilea rând, martorii de pe toate plăcile ulterioare trebuie să fie evaluați pentru asigurarea consecvenței cu placa 1. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Capacitatea de a efectua în mod consecvent testul ar trebui să fie demonstrată prin dezvoltarea și întreținerea unei baze de date istorice pentru estrogenul și martorii de referință. Ca o măsură a reproductibilității în cadrul laboratorului, pot fi utilizate abateri standard (SD) sau coeficienți de variație (CV) pentru mediile de pe curbele estrogenului și martorului de referință ca lianți slabi care corelează parametrii din cadrul mai multor experimente. La analizarea rezultatelor privind martorii de pe placă din cadrul fiecărei testări, precum și pentru fiecare substanță chimică de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională.

În plus, ar trebui să fie îndeplinite următoarele principii referitoare la criteriile de acceptabilitate:

— Datele ar trebui să fie suficiente pentru evaluarea cantitativă a legării de ER.

— Concentrațiile testate ar trebui să rămână în intervalul de solubilitate al substanței chimice de testat.

Analiza datelor

21. Procedura specifică de analiză a datelor pentru datele privind legarea prin saturație și legarea competitivă ar trebui să respecte principiile esențiale pentru caracterizarea interacțiunilor receptor-ligand. De regulă, datele privind legarea prin saturație sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie neliniară care determină legarea totală și legarea nespecifică. Este posibil să fie necesară o corecție pentru sărăcirea ligandului [de exemplu, Swillens, 1995, (19)] atunci când se stabilește Bmax și Kd. Datele provenite din analizele privind legarea competitivă sunt transformate, de regulă [de exemplu, legarea și concentrația procentuală a substanței chimice de testat

▼M8

(log M)]. Estimările valorii log (IC_{50}) pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri. În urma unei analize inițiale, ar trebui să se stabilească parametrii curbei și să se verifice vizual cât de bine sunt încadrate datele privind legarea pe curba de legare competitivă generată. În unele cazuri, poate fi necesară o analiză suplimentară pentru a obține cea mai bună curbă [de exemplu, prin stabilirea de limite pentru partea superioară și/sau cea inferioară a curbei, utilizarea regulii de 10 %, a se vedea apendicele 4 și referința 2 (secțiunea III.A.2).

22. Îndeplinirea criteriilor de acceptabilitate (punctul 20) indică faptul că sistemul de analiză funcționează în mod corespunzător, dar nu asigură faptul că orice test specific va genera date precise. Reproducerea rezultatelor corecte ale primului test indică cel mai bine faptul că au fost generate date precise.

Criterii generale de interpretare a datelor

23. În prezent, nu există nicio metodă convenită în mod universal pentru interpretarea datelor privind legarea de ER. Însă evaluările calitative (de exemplu, liant/non-liant) și/sau cantitative [de exemplu, log IC_{50}, afinitatea de legare relativă (RBA)] ale activității mediate de hrER ar trebui să fie bazate pe date empirice și un raționament științific solid.

Raport testului

24. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Test:

— analiza utilizată;

Martor/substanță de referință/substanță chimică de testat

— sursa, numărul lotului, data limită de utilizare, dacă sunt disponibile

— stabilitatea substanței chimice de testat, dacă se cunoaște;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent, dacă se cunosc;

— măsurarea pH-ului, a osmolalității și a precipitatului în mediul de cultură în care s-a adăugat substanța chimică de testat, după caz.

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritate, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este practic fezabil etc.

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

▼**M8**

Solvent/vehicul:

— caracterizare (natură, furnizor și lot);

— justificarea alegerii solventului/vehiculului;

— solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testat în solvent/vehicul, dacă se cunoaște;

Receptori:

— sursa receptorilor (furnizor, nr. catalog, lot, specia receptorului, concentrația receptorului activ pusă la dispoziție de furnizor, certificarea din partea furnizorului)

— caracterizarea receptorilor (inclusiv rezultatele privind legarea prin saturație): Kd, Bmax,

— păstrarea receptorilor

— ligand marcat radioactiv:

— furnizor, nr. catalog, lot, activitate specifică

Condiții de testare:

— limitele de solubilitate în condiții de analiză;

— componența soluției tampon de legare;

— concentrația receptorului;

— concentrația detectorului (și anume, ligand marcat radioactiv);

— concentrațiile substanței chimice de testat;

— procent de vehicul în analiza finală;

— temperatura și timpul de incubație;

— metoda legării/separării;

— martori pozitivi și negativi/substanțe de referință;

— criterii pentru caracterizarea testelor ca fiind pozitive, negative sau echivoce;

Verificarea de acceptabilitate:

— valorile efective IC_{50} și Hillslope pentru martorii pozitivi/substanțele de referință testate în paralel;

Rezultate:

— date brute și integrate/libere;

— verificarea confirmării de denaturare, dacă este cazul;

— dacă există, cea mai redusă valoare a concentrației efective (LEC);

— valorile RBA și/sau IC_{50}, după caz;

— relația concentrație-răspuns, dacă este posibil;

— analize statistice, dacă este cazul, împreună cu o măsură de eroare și de încredere (de exemplu, SEM, SD, CV sau 95 % CI) și o descriere a modului în care au fost obținute aceste valori;

▼**M8**

Discutarea rezultatelor:

— aplicarea regulii de 10 %

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 34), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) OCDE (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 226), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 222), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. și Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication nr. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 67), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japonia. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼M8

Apendicele 1

Definiții și Abrevieri

Regula de 10 %: O opțiune de excludere de la analiză a punctelor de date în cazul în care media replicilor pentru valoarea procentuală a legării specifice de [^{3}H]17β-estradiol este de cel puțin 10 %, peste nivelul observat pentru valoarea medie la o concentrație mai mică (a se vedea apendicele 4).

Criterii de acceptabilitate: Standarde minime pentru efectuarea de controale experimentale și standarde de referință. Toate criteriile de acceptabilitate ar trebui să fie îndeplinite pentru ca un experiment să fie considerat valabil.

Precizie (concordanță): Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (1).

CF: Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea disruptorilor endocrini.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV: Coeficient de variație

E2: 17β-estradiol

ED: Perturbare endocrină

hERα: Receptor alfa de estrogen uman

ER: Receptor de estrogen

Activitate estrogenă: Capacitatea unei substanțe chimice de a imita 17β-estradiol în capacitatea sa de a lega receptori de estrogen. Legarea de hERα poate fi detectată prin această metodă de testare.

IC 50: Jumătate din concentrația maximă efectivă a unei substanțe chimice de testat inhibitoare.

ICCVAM: Comitetul de coordonare între agenții cu privire la validarea metodelor alternative (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

Reproductibilitatea între laboratoare: Un indicator al măsurii în care diferite laboratoare calificate, utilizând același protocol și testând aceleași substanțe, pot produce rezultate similare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Reproductibilitatea între laboratoare este determinată în timpul proceselor de pre-validare și de validare și indică măsura în care un test poate fi transferat cu succes între laboratoare, denumită de asemenea, reproductibilitate între laboratoare (1).

Reproductibilitatea în cadrul laboratorului: O determinare a măsurii în care persoane calificate din cadrul aceluiași laborator pot repeta cu succes rezultatele la momente diferite, utilizând un protocol specific. Aceasta este denumită, de asemenea, reproductibilitate în cadrul laboratorului (1).

LEC: Cea mai scăzută concentrație efectivă este cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat care produce un răspuns (și anume, cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat la care coeficientul de inducție multiplicată este diferit din punct de vedere statistic de martorul tratat cu vehicul testat în paralel).

▼M8

Testul „me-too”: O expresie colocvială utilizată pentru un test care este, din punct de vedere structural și funcțional, similar cu o metodă de testare de referință validată și acceptată. Utilizată alternativ cu metoda de testare similară.

PBTG: Orientarea privind testarea pe baza performanței

Standarde de performanță: Standarde bazate pe o metodă de testare validată, care asigură baza pentru evaluarea comparabilității unui test propus similar din punct de vedere al mecanismului și funcțional. Sunt incluse (1) componente esențiale ale testului; (2) o listă minimală de substanțe chimice de referință selectate dintre substanțele chimice utilizate pentru a demonstra performanța acceptabilă a metodei de testare validate; și (3) nivelurile comparabile de precizie și fiabilitate, pe baza rezultatelor obținute în cazul metodei de testare validate, care ar trebui să fie demonstrate prin testul propus la evaluarea acesteia pe baza listei minimale de substanțe chimice de referință (1).

Substanțe de verificare: Un subset de substanțe de referință incluse în standardele de performanță, care pot fi utilizate de către laboratoare pentru a demonstra competența tehnică cu o analiză standardizată. Criteriile de selecție pentru aceste substanțe includ, de regulă, faptul că acestea reprezintă intervalul de răspunsuri, sunt disponibile în comerț și pentru acestea există date de referință de înaltă calitate.

Competență: Capacitatea demonstrată de a efectua în mod corespunzător un test înainte de a testa substanțe necunoscute.

Estrogen de referință: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Metode de testare de referință: Testele pe care se bazează PBTG 493.

RBA:: Afinitate de legare relativă. Valoarea RBA a unei substanțe se calculează ca procent din log (IC_{50}) pentru substanță cu raportare la log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol

Relevanță: Descrierea relației dintre un test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (1).

Fiabilitate: Un indicator al faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare.

SD: Abatere standard.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

Metodă de testare validată: Un test pentru care au fost realizate studii de validare pentru determinarea relevanței (inclusiv a preciziei) și a fiabilității pentru un anumit scop. Este important de precizat faptul că este posibil ca performanțele unei metode de testare validate să nu fie suficiente din punct de vedere al preciziei și fiabilității astfel încât aceasta să fie considerată acceptabilă pentru scopul propus (1).

Validare: Procesul prin care se stabilește fiabilitatea și relevanța unei anumite abordări, metode, test, proces sau evaluări specifice pentru un scop definit (1).

▼**M8**

Apendicele 2

ANALIZELE DE LEGARE PRIN SATURAȚIE ȘI LEGARE COMPETITIVĂ DE RECEPTORUL DE ESTROGEN (ERA) IN VITRO FREYBERGER-WILSON UTILIZÂND RECOMBINANT ERA DE LUNGIME TOTALĂ

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză de legare prin saturație și legare competitivă *in vitro* de receptorul de estrogen (ERα) utilizează un receptor uman de lungime totală ERα (hrERα) care este produs în și izolat de celulele unor insecte infectate cu baculovirus. Protocolul, care a fost dezvoltat de Freyberger și Wilson, a fost supus unui studiu internațional de validare în mai multe laboratoare (2) care a demonstrat relevanța și fiabilitatea acestuia în scopul prevăzut al analizei.

2. Această analiză este o procedură de depistare pentru identificarea substanțelor care pot lega hrERα în lungime totală. Aceasta este utilizată pentru a stabili capacitatea unei substanțe chimice de testat de a concura cu 17β-estradiol pentru legarea de hrERα. Rezultatele cantitative ale analizei pot include valoarea IC_{50} (un indicator al concentrației unei substanțe chimice de testat care este necesară pentru a desprinde jumătate din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα) și afinitățile de legare relative ale substanțelor chimice de testat pentru hrERα comparativ cu 17β-estradiol. În scopul depistării substanțelor chimice, rezultatele acceptabile ale analizei calitative pot include clasificări ale substanțelor chimice de testat ca lianți ai hrERα, non-lianți sau substanțe echivoce pe baza criteriilor descrise pentru curbele pentru legare.

3. Analiza folosește un ligand radioactiv care necesită obținerea de către laborator a unei licențe pentru materiale radioactive. Toate procedurile cu radioizotopi și substanțe chimice periculoase ar trebui să respecte regulamentele și procedurile descrise în legislația națională.

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „**INTRODUCERE GENERALĂ**” și „**COMPONENTE ALE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER**” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza legării hrERα măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([3H]17-β-estradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor.

6. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

7. Scopul experimentului de legare prin saturație este de a caracteriza un anumit lot de receptori în ceea ce privește afinitatea de legare și numărul în pregătirea pentru experimentul de legare competitivă. Experimentul de legare prin saturație măsoară, în condiții de echilibru, afinitatea unei concentrații fixe a receptorului de estrogen pentru ligandul său natural (reprezentată de constanta de disociere, Kd) și concentrația locurilor cu receptor activ (Bmax).

▼M8

8. Experimentul de legare competitivă măsoară afinitatea unei substanțe de a concura cu [3H]17β-estradiol pentru legarea de ER. Afinitatea este cuantificată prin concentrația substanței chimice de testat care, în stare de echilibru, inhibă 50 % din legarea specifică a [3H]17β-estradiol (denumită „concentrație inhibitoare de 50 %" sau IC50). Aceasta poate fi evaluată, de asemenea, utilizând afinitatea de legare relativă (RBA, în raport cu valoarea IC50 a estradiolului, măsurată separat în cadrul aceluiași test). Experimentul de legare competitivă măsoară legarea [3H]17β-estradiol la o concentrație fixă în prezența unui interval mare (opt ordine de mărime) de concentrații ale substanței chimice de testat. Datele sunt apoi corelate, dacă este posibil, într-o formă de ecuație Hill (Hill, 1910) care descrie desprinderea ligandului radioactiv de către un liant competitiv dintr-un loc. Gradul de desprindere a estradiolului marcat radioactiv, în stare de echilibru, este folosit pentru a caracteriza substanța chimică de testat ca liant, non-liant sau ca o substanță care generează un răspuns echivoc.

PROCEDURA

Demonstrarea performanței acceptabile a proteinei hrERα

9. Înainte de efectuarea sistematică a analizelor de legare prin saturație și de legare competitivă, ar trebui să se demonstreze performanța corespunzătoare a fiecărui nou lot de hrERα în laboratorul în care acesta va fi utilizat. Pentru a demonstra performanța ar trebui să se utilizeze un proces în două etape. Aceste etape sunt următoarele:

— Se desfășoară o analiză de legare a [^{3}H]-17β-estradiol prin saturație pentru a demonstra specificitatea și saturația hrERα. Analiza regresiei non-liniare a acestor date (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) și schița Scatchard ulterioară ar trebui să documenteze afinitățile de legare de hrERα ale [^{3}H]-17β-estradiol (Kd) și numărul receptorilor (Bmax) pentru fiecare lot de hrERα.

— Se desfășoară o analiză de legare competitivă cu ajutorul substanțelor martor [estrogenul de referință (17β-estradiol)], al unui liant slab (de exemplu, noretinodrel sau noredronă) și al unui non-liant (octiltrietoxisilan, OTES). Fiecare laborator ar trebui să stabilească o bază de date istorică pentru a documenta consecvența IC_{50} și alte valori relevante pentru estrogenul de referință și liantul slab obținute în urma experimentelor și pentru diferite loturi de hrERα. Parametrii curbelor privind legarea competitivă pentru substanțele martor ar trebui să se încadreze în limitele intervalului de încredere de 95 % (a se vedea tabelul 1), acestea fiind dezvoltate pe baza datelor din laboratoarele care au participat la studiul de validare pentru această analiză (2).

Tabelul 1

Criterii de performanță elaborate pentru estrogenul de referință și liantul slab, analiza FW privind legarea hrER.

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
17β-estradiol	Partea superioară (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Partea inferioară (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Panta Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
Noretinodrel	Partea superioară (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Partea inferioară (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Panta Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindronă [c]	Partea superioară (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Partea inferioară (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Panta Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50} (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) Media (n) ± abaterea standard (SD) au fost calculate utilizând estimările parametrilor de creare a curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în patru laboratoare în timpul studiului de validare (a se vedea anexa N la referința 2).

([b]) Intervalele de încredere de 95 % sunt furnizate ca ghid pentru criteriile de acceptabilitate.

([c]) Testarea noretindronei a fost opțională pentru sub-sarcina 4 în timpul studiului de validare (a se vedea referința 2, a se vedea sub-sarcina 4). Astfel, media ± SD (n) au fost calculate folosind estimările curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în două laboratoare.

Intervalul pentru IC_{50} *va depinde de valoarea Kd specifică preparatului cu receptori și de concentrația ligandului marcat radioactiv utilizat în cadrul fiecărui laborator. Va fi acceptabilă o ajustare adecvată pentru intervalul* IC_{50} *în funcție de condițiile utilizate pentru desfășurarea analizei.*

Demonstrarea competenței laboratorului

10. A se vedea punctele 17 și 18, precum și tabelul 2 din „**COMPONENTE ALE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA DE hrER**” ale acestei metode de testare. Fiecare analiză (legare prin analiză și legare competitivă) ar trebui să conste în trei testări independente (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactivi) în zile diferite și fiecare testare ar trebui să cuprindă trei replici.

Determinarea concentrației receptorului (hrERα)

11. Concentrația receptorului activ variază ușor în funcție de lot și de condițiile de păstrare. Din acest motiv, ar trebui să se determine concentrația receptorului activ, astfel cum a fost primită de la furnizor. Aceasta va determina concentrația corespunzătoare a receptorului activ la momentul testării.

12. În condiții corespunzătoare legării competitive (și anume, 1 nM [^{3}H]-estradiol), ar trebui să se incubeze concentrații nominale de 0,25, 0,5, 0,75 și 1 nM ale receptorului în absența (legare totală) și prezența (legare nespecifică) unei cantități de 1 μM estradiol neetichetat. Legarea specifică, calculată ca diferență între legarea totală și legarea nespecifică, este schițată în comparație cu concentrația nominală a receptorului. Concentrația receptorului, care determină valorile specifice de legare, reprezentând 20 % din marcajul radioactiv adăugat, este corelată cu concentrația nominală a receptorului și această concentrație a receptorului ar trebui utilizate pentru experimente de legare prin saturație și legare competitivă. În mod frecvent, o concentrație hrER finală de 0,5 nM va respecta această condiție.

▼M8

13. În cazul în care criteriul de 20 % nu poate fi respectat în mod repetat, ar trebui verificat setul experimental pentru identificarea unor posibile erori. Nerespectarea criteriului de 20 % poate indica faptul că există foarte puțini receptori activi în lotul recombinant și ar trebui atunci să se aibă în vedere utilizarea altui lot de receptori.

Analiza saturației

14. Ar trebui să se evalueze opt concentrații din ce în ce mai mari de [^{3}H]17β-estradiol în trei replici, în următoarele trei condiții (a se vedea tabelul 2):

— în absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în prezența ER. Astfel se determină legarea totală prin măsurarea radioactivității în godeurile care au doar [3H]17β-estradiol.

— În prezența unei concentrații multiplicate de 1 000 de ori de 17β-estradiol nemarcat peste 17β-estradiol marcat și în prezența ER. Intenția acestei condiții este de a satura locurile cu legare activă cu 17β-estradiol nemarcat și, prin măsurarea radioactivității în godeuri, de a determina legarea nespecifică. Orice cantitate de estradiol rămasă la cald, care se poate lega de receptor, se consideră că se leagă într-un loc nespecific, întrucât cantitatea de estradiol rece ar trebui să fie într-o concentrație atât de mare încât să se lege de toate locurile specifice disponibile de pe receptor.

— În absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în absența ER (determinarea radioactivității totale)

Preparatul de [^{3}H]-17β-estradiol și soluții 17β-estradiol nemarcate

15. Diluțiile de [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să fie preparate prin adăugarea de soluție tampon pentru analiză la o soluție mamă de 12 nM de [^{3}H]-17β-estradiol pentru a obține concentrații inițiale de la 0,12 nM la 12 nM. Concentrațiile finale de analiză, de la 0,03 la 3,0 nM, se vor obține prin adăugarea a 40 µl din aceste soluții în godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (într-un volum final de 160 µl). Prepararea soluției tampon de analiză, a soluției mamă [^{3}H]-17β-estradiol și a diluțiilor, precum și determinarea concentrațiilor sunt descrise în detaliu în protocolul FW (2).

16. Diluțiile soluțiilor etanolice cu 17β-estradiol ar trebui să se prepare prin adăugarea de soluție tampon de analiză pentru a obține opt concentrații în creștere, cu valori inițiale de la 0,06 µM la 6 µM. Prin adăugarea a 80 µl din aceste soluții în godeurile de testare respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (într-un volum final de 160 µl), se vor obține concentrațiile finale de analiză, de la 0,03 µM la 3 µM. Concentrația finală de 17β-estradiol nemarcat în fiecare godeu din cadrul analizei privind legarea nespecifică ar trebui să fie de 1 000 de ori concentrația marcată a [^{3}H]-17β- estradiol. Prepararea diluțiilor 17β-estradiol nemarcate este descrisă în detaliu în protocolul FW (2).

17. Ar trebui să fie utilizată concentrația nominală a receptorului care prezintă o legare specifică de 20 ± 5 % (a se vedea punctele 12-13). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată imediat înainte de utilizare.

18. Plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri sunt pregătite astfel cum este ilustrat în tabelul 2, cu 3 replici per concentrație. În apendicele 2.2 este prezentat un exemplu de distribuire a concentrației și volumului de [^{3}H]-17β-estradiol, de 17β-estradiol nemarcat, de soluție tampon și de receptor.

▼M8

Tabelul 2

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Legare totală (solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER+ 0,10 µM E_2			Legare nespecifică
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: receptor de estrogen
E2:: 17β-estradiol nemarcat

19. Plăcile de microtitrare pentru analiză ar trebui să fie incubate de la 2° până la 8 °C timp de 16-20 de ore și așezate pe un rotator în perioada de incubație.

Măsurarea [3H]-17β-estradiol legat de hrERα

20. [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα ar trebui să fie separat de [^{3}H]-17β-estradiol liber prin adăugarea a 80 µl de suspensie rece DCC în fiecare godeu, agitându-se plăcile de microtitrare timp de 10 minute și apoi supuse centrifugării timp de 10 minute la aproximativ 2 500 RPM. Pentru a reduce la minim desprinderea legăturii [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα în cursul acestui proces, este extrem de important ca soluțiile tampon și godeurile de analiză să fie păstrate la temperaturi între 2 și 8 °C și ca fiecare etapă să fie parcursă rapid. Este necesar un agitator pentru plăcile de microtitrare pentru ca acestea să fie prelucrate în mod eficient și rapid.

21. Apoi ar trebui să se extragă cu multă atenție o cantitate de 50 µl de supernatant care conține [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα pentru a evita orice contaminare a godeurilor prin atingerea DCC și care ar trebui să fie așezată pe o a doua placă de microtitrare.

22. Apoi se adaugă în fiecare godeu (A1-B12 și D1-E12) 200 µl de fluid de scintilație, care poate să convertească energia cinetică a emisiilor nucleare în energie luminoasă. Godeurile G1-H12 (identificate ca valoare DPMS totală) reprezintă diluții în serie de [^{3}H]-17β-estradiol (40 µl) care ar trebui introduse direct în lichidul de scintilație din godeurile plăcii de măsurare, astfel cum se indică în tabelul 3, și anume, aceste godeuri conțin doar 200 µl de fluid de scintilație și diluția corespunzătoare de [3H]-17β-estradiol. Aceste măsuri demonstrează cât de mult [^{3}H]-17β-estradiol, în DPMS, a fost adăugat în fiecare set de godeuri pentru legarea totală și legarea nespecifică.

▼M8

Tabelul 3

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație, măsurarea radioactivității

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E2 + ER			Legare totală (solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER+ 0,10 µM E_2			Legare nespecifică
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER+ 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (total dpms)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			Total dpms (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[3H] E2:: [3H]-17β-estradiol
ER:: receptor de estrogen
E2:: 17β-estradiol nemarcat
dpms:: dezintegrări pe minut
(*) Diluțiile în serie la cald ale [^{3}H]-estradiol marcat prezentate aici ar trebui adăugate direct în 200 µl de fluid de scintilație în godeurile G1-H12.

23. Măsurarea ar trebui să înceapă cu un decalaj de cel puțin 2 ore, iar timpul de numărare ar trebui să fie de 40 de minute per godeu. Ar trebui să se utilizeze un contor de scintilație pe placa de microtitrare pentru determinarea dpm/godeu cu o corecție de atenuare. În mod alternativ, în cazul în care nu există un contor de scintilație pentru placa de microtitrare, eșantioanele pot fi măsurate într-un contor convențional. În aceste condiții, se poate avea în vedere o reducere a timpului de numărare.

Analiza privind legarea competitivă

24. Analiza privind legarea competitivă măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. La fiecare concentrație din cadrul unei testări ar trebui să se utilizeze trei replici concomitent. În plus, pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să se efectueze trei teste la momente diferite. Substanțele pentru analiză ar trebui să fie configurate pe una sau mai multe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri.

Martori

25. Atunci când se efectuează analiza, ar trebui să se includă în fiecare experiment solventul și martorii tratați în paralel (și anume, estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și non-liant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină fiecare (i) E2 și un liant slab în trei replici la o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în cel puțin trei replici. Procedurile pentru prepararea soluției tampon de analiză, a martorilor, [^{3}H]-17β-estradiol, hrERα și a soluțiilor cu substanță chimică de testat sunt descrise la referința 2 (anexa K, a se vedea Protocolul privind testarea FW).

▼**M8**

Martor tratat cu solvent:

26. Martorul tratat cu solvent indică faptul că solventul nu interacționează cu sistemul de testare și, de asemenea, măsoară legarea totală (TB). Etanolul este solventul preferat. În mod alternativ, în cazul în care cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat nu este solubilă în etanol, poate fi utilizat DMSO. Concentrația de etanol sau DMSO, dacă este utilizată, în godeurile analizei finale este de 1,5 % și nu poate să depășească 2 %.

Martor tampon:

27. Martorul tampon (BC) nu ar trebui să conțină nici solvent, nici substanță chimică de testat, ci toate celelalte componente ale analizei. Rezultatele martorului tampon sunt comparate cu martorul tratat cu solvent pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză.

Liant puternic (estrogen de referință)

28. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) este ligandul endogen și se leagă cu un grad de afinitate mare de ER, subtipul alfa. Pentru fiecare analiză privind legarea competitivă hrERα ar trebui să se pregătească o curbă standard utilizând 17β-estradiol nemarcat pentru a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp, în același laborator. Ar trebui să se prepare opt soluții cu 17β-estradiol nemarcate în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse în intervalul 100 nM-10 pM (de la -7 [logM] la -11 [logM]), repartizate după cum urmează: (-7 [logM], -8 [logM], -8,5 [logM], -9 [logM], - 9,5 [logM], -10 [logM], -11 [logM]). Cea mai mare concentrație de 17β-estradiol nemarcată (1 μM) servește, de asemenea, drept indicator de legare nespecifică. Această concentrație se distinge prin eticheta „NSB” în tabelul 4, chiar dacă aceasta este, de asemenea, integrată în curba standard.

Liant slab

29. Un liant slab [noretinodrel (CAS 68-23-5) sau noretindronă (CAS 68-22-40] ar trebui să fie inclus pentru a demonstra sensibilitatea fiecărui experiment și a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp. Ar trebui să se prepare opt soluții de liant slab în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse între 3 nM și 30 μM (de la -8,5 [logM] la -4,5 [logM]), repartizate după cum urmează: -4,5 [logM], -5 [logM], -5,5 [logM], -6 [logM], -6,5 [logM], -7 [logM],-7,5 [logM], -8,5 [logM].

Non-liant

30. Ca martor negativ ar trebui să se utilizeze octiltrietoxisilan (OTES, CAS 2 943-75-1) (non-liant). Acesta asigură faptul că, așa cum este efectuată analiza, va detecta momentul în care substanțele chimice de testat nu se leagă de hrERα. Ar trebui să se prepare opt soluții de non-liant în etanol, având concentrații în godeurile de analiză cuprinse între 0,1 nM și 1 000 μM (de la -10 [logM] la -3 [logM]), în creșteri treptate ale valorii log. Ftalatul de di-*n*-butil (DBP) poate fi utilizat ca și non-liant martor alternativ. S-a demonstrat că solubilitatea sa maximă este -4 [logM].

Concentrația hrERα

31. Ar trebui să fie utilizată cantitatea de receptori care prezintă o legare specifică de 20 ± 5 % de 1 nm de ligant radioactiv (a se vedea punctele 12-13 din apendicele 2). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată imediat înainte de utilizare.

[3H]-17β-estradiol

32. Concentrația [^{3}H]-17β-estradiol în godeurile de analiză ar trebui să fie de 1,0 nM.

▼**M8**

Substanțe chimice de testat

33. În primul rând, trebuie să se efectueze un test al solubilității pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea protocolului de testare. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul (a se vedea, de asemenea, punctul 35). Substanța chimică de testat ar trebui să fie testată folosind curbe ale concentrației repartizate la 8 log, astfel cum sunt definite în testul anterior de stabilire a intervalului. Concentrațiile din cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns.

34. Diluțiile substanței chimice de testat ar trebui să fie preparate în solvent adecvat (a se vedea punctul 26 din apendicele 2). În cazul în care concentrația maximă a substanței chimice de testat nu este solubilă nici în etanol, nici în DMSO, iar dacă se adaugă mai mult solvent, concentrația solventului în eprubeta finală ar fi mai mare decât limita acceptabilă, concentrația maximă poate fi redusă la următoarea concentrație inferioară. În acest caz, se poate adăuga o concentrație suplimentară la limita inferioară a seriei de concentrații. Alte concentrări din cadrul seriei ar trebui să rămână neschimbate.

35. Soluțiile cu substanță chimică de testat ar trebui să fie monitorizate atent atunci când se adaugă la godeul de analiză, deoarece substanța chimică testată se poate precipita atunci când este adăugată în acesta. Datele pentru toate godeurile care conțin precipitat ar trebui să fie excluse de la formarea curbei, iar motivul excluderii datelor ar trebui să fie consemnat.

36. În cazul în care există informații anterioare din alte surse care furnizează o valoare log(IC_{50}) pentru o substanță chimică de testat, ar putea fi adecvat ca diluțiile să se repartizate geometric [și anume, 0,5 unități log în jurul valorii preconizate log(IC_{50}). Rezultatul final ar trebui să reflecte o marjă suficientă de concentrații pe fiecare parte a valorii log(IC_{50}), inclusiv pe partea superioară și cea inferioară, astfel încât curba pentru legătură să poată fi caracterizată în mod corespunzător.

Organizara plăcii de analiză

37. Ar trebui să se pregătească plăci de microtitrare etichetate luând în considerare incubațiile în șase replici cu coduri pentru martorul tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a estrogenului de referință, care constituie, de asemenea, un indicator al legăturii nespecifice (NSB), și soluția tampon martor, precum și luând în considerare incubațiile în trei replici cu coduri pentru fiecare dintre cele opt concentrații ale martorului non-liant (octiltrietoxisilan), cele șapte concentrații inferioare pentru estrogenul de referință, cele opt niveluri ale dozelor de concentrații ale liantului slab și cele opt concentrații ale fiecărei substanțe chimice de testat (TC). În tabelul 4 de mai jos este prezentat un exemplu de model de diagramă a plăcii pentru curbele de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martor. Se utilizează plăci de microtitrare suplimentare pentru substanțele chimice de testat, care ar trebui să includă martori pe placă (și anume, 1) E2 și un liant slab în trei replici având o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (de aproximativ IC_{50}); 2) martor tratat cu solvent și soluție de legare nespecifică, fiecare în șase replici (tabelul 5). În apendicele 2.3 este prezentat un exemplu de fișă de configurare a plăcilor de microtitrare pentru analiză competitivă, care utilizează trei substanțe chimice de testat necunoscute. Concentrațiile indicate în tabelele 4 și 5 reprezintă concentrațiile

▼M8

finale ale analizei. Concentrația maximă pentru E2 ar trebui să fie 1×10^{-7} M, iar pentru liantul slab, ar trebui să se utilizeze cea mai mare concentrație utilizată pentru liantul slab pe placa 1. Concentrația IC_{50} trebuie să fie stabilită de laborator pe baza bazei sale de date cu martori testați anterior. Se preconizează că această valoare va fi similară cu cea observată în studiile de validare (a se vedea tabelul 1).

Tabelul 4

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, curbe de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori (placa 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (doar solvent)			TB (doar solvent)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Soluție săracă (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)			Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)			Martor tampon			Martor tampon		

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)
(*) soluție săracă reală, godeul nu este utilizat
(**) soluția săracă nu a fost utilizată în timpul incubației, ci pentru a confirma radioactivitatea totală adăugată.

Tabelul 5

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, curbe de concentrație complete pentru substanțele chimice de testat și martorii de pe placă.

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (doar solvent)			TB (doar solvent)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)

▼M8

Încheierea analizei privind legarea competitivă

38. Astfel cum se arată în tabelul 6, în fiecare godeu ar trebui să se adauge 80 µl de martor tratat cu solvent, martor tampon, estrogen de referință, liant slab, non-liant și substanțe chimice de testat preparate în soluția-tampon a analizei. Apoi se adaugă în fiecare godeu 40 µl dintr-o soluție 4 nM [3H]-17β-estradiol. După o rotire ușoară timp de 10-15 minute la temperaturi între 2° și 8 °C, ar trebui să se adauge 40 µl din soluția hrERα. Plăcile de microtitrare pentru analiză ar trebui să fie incubate de la 2° până la 8 °C timp de 16-20 de ore și așezate pe un rotator în perioada de incubație.

Tabelul 6

Volumul componentelor de analiză pentru testul privind legarea competitivă hrER, plăci de microtitrare

Volum (µl)	Componentă
80	1/7-β-estradiol nemarcat, noretinodrel, OTES, substanțe chimice de testat, solvent sau soluție tampon
40	4 nM de soluție [^{3}H]-17β-estradiol
40	Soluție hrERα având concentrația determinată
160	Volumul total în fiecare godeu de analiză

39. Cuantificarea legării [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, în urma separării [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα de [^{3}H]-17β-estradiol liber, prin adăugarea, în fiecare godeu, a 80 µl de suspensie DCC rece, ar trebui să fie efectuată astfel cum este descris la punctele 20-23 pentru analiza privind legarea prin saturație.

40. Godeurile H1-6 [identificate ca având soluție săracă (pentru mediu cald) în tabelul 4] reprezintă DPMS al [^{3}H]-estradiol marcat în 40 µl. Partea alicotă de 40 µl ar trebui să fie introdusă direct în lichidul de scintilație din godeurile H1-H6.

Criterii de acceptabilitate

Analiza privind legarea prin saturație

41. Curba specifică privind legarea ar trebui să ajungă la un platou, întrucât au fost utilizate concentrații crescătoare de [^{3}H]-17β-estradiol, care indică saturația hrERα cu ligandul.

42. Legarea specifică la 1 nM de [3H]-17β-estestradiol ar trebui să fie situată în intervalul acceptabil 15 %-25 % din radioactivitatea totală măsurată medie adăugată de la o testare la alta. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine, iar analiza saturației ar trebui să fie repetată.

43. Datele ar trebui să producă o reprezentare grafică liniară Scatchard.

44. Legarea nespecifică nu ar trebui să fie excesivă. Valoarea pentru legarea nespecifică ar trebui, de regulă, să fie < 35 % din legarea totală. Însă, raportul poate depăși ocazional această limită atunci când se măsoară valoarea dpm foarte scăzută pentru concentrația minimă a substanței 17β-estradiol marcat radioactiv testate.

▼M8

Analiza privind legarea competitivă

45. Concentrațiile din ce în ce mai mari de 17β-estradiol nemarcat ar trebui să desprindă [^{3}H]-17β- estradiol de receptor într-un mod compatibil cu o legarea competitivă dintr-un singur punct.

46. Valoarea IC_{50} pentru estrogenul de referință (și anume, 17β-estradiol) ar trebui să fie aproximativ egal cu concentrația molară a [^{3}H]-17β-estradiol, plus valorile Kd determinate din analiza privind legarea prin saturație.

47. Legarea specifică totală ar trebui să se situeze în mod consecvent în intervalul acceptabil de 20 ± 5 % atunci când concentrația medie măsurată a radioactivității totale adăugate în fiecare godeu a fost de 1 nM în toate testele. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine.

48. Solventul nu ar trebui să modifice sensibilitatea sau reproductibilitatea analizei. Rezultatele martorului tratat cu solvent (godeuri TB) sunt comparate cu martorul tampon pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză. Rezultatele pentru TB și martorul tampon ar trebui să fie comparabile în cazul în care nu există niciun efect al solventului asupra analizei.

49. Non-liantul nu ar trebui să desprindă mai mult de 25 % din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα atunci când se testează maxim 10^{-3} M (OTES) sau 10^{-4} M (DBP).

50. Au fost elaborate criterii de performanță pentru estrogenul de referință și doi lianți slabi (de exemplu, noretinodrel, noretindronă), utilizând date din studiul de validare a analizei FW privind legarea hrER (anexa N la referința 2). Sunt prezentate intervale de încredere de 95 % pentru media (n) +/- SD pentru toate testele pe martori din laboratoarele participante la studiul de validare. Au fost calculate intervale de încredere de 95 % pentru parametrii de formare a curbei (și anume, partea superioară, partea inferioară, Hillslope, $logIC_{50}$) pentru estrogenul de referință și lianții slabi, precum și pentru valoarea log_{10}RBA a lianților slabi în raport cu estrogenul de referință, fiind furnizate ca și criterii de performanță pentru martorii pozitivi. Tabelul 1 furnizează intervalele preconizate pentru parametrii de formare a curbei care pot fi utilizați ca și criterii de performanță. În practică, intervalul IC_{50} poate varia ușor, în funcție de valoarea Kd a preparatul cu receptori și de concentrația ligandului.

51. Nu au fost elaborate criterii de performanță pentru parametrii de formare a curbei în cazul substanțelor chimice de testat din cauza gamei largi de substanțe chimice de testat posibile și a variației posibilelor afinități și rezultatele (de exemplu, curbă completă, curbă parțială, fără formă de curbă). Însă, la analizarea rezultatelor din cadrul fiecărei testări, în cazul unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară (de exemplu, o legare de 90-100 %) a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Martorii din cadrul fiecărei serii, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se apropie de măsurile de performanță raportate pentru această analiză FW și să fie în concordanță cu datele privind martorii testați anterior din fiecare laborator.

▼M8

ANALIZA DATELOR

Analiza privind legarea prin saturație

52. Se măsoară atât legarea totală, cât și cea nespecifică. Pornind de la aceste valori, se calculează legarea specifică a [^{3}H]-17β-estradiol, în condiții de echilibru, la concentrații în creștere, scăzând valoarea legării nespecifice din total. Un grafic al legării specifice versus concentrația [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să ajungă al un platou pentru o legare specifică maximă care indică o saturație a hrERα cu [^{3}H]-17β-estradiol. În plus, analiza datelor ar trebui să documenteze legarea [^{3}H]-17β- estradiol de un singur loc de legare cu un grad ridicat de afinitate. Legarea nespecifică, cea totală și cea specifică ar trebui să fie ilustrate pe o curbă de legare prin saturație. În cadrul unei analize ulterioare a acestor date ar trebui să se utilizeze o analiză de regresie neliniară (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) cu o reprezentare finală a datelor sub forma unui grafic Scatchard.

53. Prin analiza datelor ar trebui să se determine valorile Bmax și Kd doar din datele privind legarea totală, pe baza ipotezei că legarea nespecifică este liniară, cu excepția cazului în care se justifică utilizarea unei metode diferite. În plus, ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Ar trebui să se recurgă întotdeauna la corecția pentru sărăcirea ligandului (de exemplu, utilizând metoda lui Swillens, 1995) atunci când se determină valorile Bmax și Kd din datele privind legarea prin saturație.

Analiza privind legarea competitivă

54. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

55. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC_{50}) ar trebui, în general, să rămână necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Nu ar trebui să se recurgă la corecția pentru sărăcirea ligandului. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab ar trebui să se calculeze ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele martorilor pozitivi și ale martorului non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând valorile de măsurare a performanței analizei de la punctele 45-50 din prezentul apendice 2.

56. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Se recomandă ca fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori (a se vedea punctul 55 de mai sus). După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]-17β-estradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător.

▼M8

Interpretarea datelor

57. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi un liant pentru hrERα în cazul în care poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns în intervalul de date este sub 50 % (figura 1).

58. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi un non-liant pentru hrERα dacă:

— poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată, situat în intervalul de date, este mai mare de 75 % sau

— nu poate fi formată o curbă de legare, iar media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.

59. Substanțele chimice de testat sunt considerate echivoce dacă nu este îndeplinită niciuna dintre condițiile de mai sus (de exemplu, punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

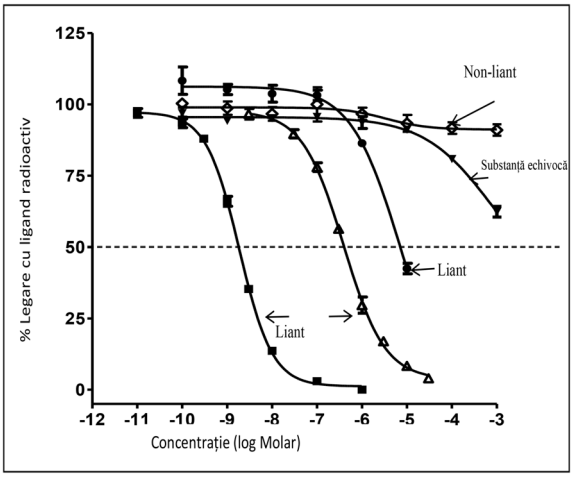
Tabelul 7

Criterii pentru clasificare pe baza curbe de legare competitive pentru o substanță chimică de testat.

Clasificare	Criterii
Liant[a]	Se poate forma o curbă de legare. **Punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este mai mic de 50 %.**
Non-liant[b]	Dacă se poate forma o curbă de legare, **punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este peste 75 %.** Dacă nu se poate forma o curbă de legare, **media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.**
Substanță echivocă[c]	Orice substanță care poate fi testată și care nu este nici liant, nici non-liant (de exemplu, punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

Figura 1

Exemple de clasificare a unei substanțe chimice de testat utilizând curba de legare competitivă.



▼**M8**

60. Se combină mai multe testări realizate într-un laborator pentru o substanță chimică de testat prin atribuirea de valori numerice fiecărei testări și calcularea mediei testelor, astfel cum se arată în tabelul 8. Rezultatele pentru testele combinate din fiecare laborator sunt comparate cu clasificarea preconizată pentru fiecare substanță chimică de testat.

Tabelul 8

Metoda de clasificare a substanței chimice de testat utilizând teste multiple în cadrul unui laborator

Pentru atribuirea unei valori fiecărei testări:	
Clasificare	Valoare numerică
Liant	2
Substanță echivocă	1
Non-liant	0
Pentru clasificarea mediei valorilor numerice ale testelor:	
Clasificare	Valoare numerică
Liant	Media $\geq$ 1,5
Substanță echivocă	0,5 $\leq$ media < 1,5
Non-liant	Media < 0,5

RAPORTUL TESTULUI

61. A se vedea punctul 24 din „**COMPONENTELE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA hrER**” din prezenta metodă de testare.

▼**M8**

Apendicele 2.1

LISTĂ DE TERMENI

[^{3}H]E2: 17β-estradiol marcat radioactiv cu tritiu

DCC: Cărbune acoperit cu dextran

E2: 17β-estradiol nemarcat (inert)

Soluția-tampon de analiză: 10 mM Tris, 10 mg albumină serică bovină /ml, 2 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 mM leupeptin, pH 7,5

hrERα: Receptor de estrogen recombinant uman alfa

Replică: Unul dintre multiplele godeuri care conțin același conținut la aceleași concentrații și sunt analizate în paralel în cadrul unei singure testări. În acest protocol, fiecare concentrație a substanței chimice de testat este testată în trei replici; cu alte cuvinte, există trei replici care sunt testate simultan la fiecare concentrație a substanței chimice de testat.

Testare: Un set complet de godeuri de pe o placă de microtitrare testate în paralel, care oferă toate informațiile necesare pentru a caracteriza legarea unei substanțe chimice de testat de hrERα (și anume, [^{3}H]-17β-estradiol total adăugat în godeul de analiză, legarea maximă a [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, legarea nespecifică și legarea totală la diferite concentrații ale substanței chimice de testat). O testare ar putea consta dintr-un singur godeu de analiză (și anume, replică) per concentrație, dar, deoarece acest protocol impune efectuarea analizei pe trei replici, o testare constă din trei godeuri de analiză per concentrație. În plus, acest protocol necesită trei teste independente (și anume, neefectuate în paralel) pe substanță chimică.

▼**M8**

Apendicele 2.2

ANALIZĂ TIPICĂ A SATURAȚIEI [^{3}H]-17B-ESTRADIOL CU TREI REPLICI DE GODEURI

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri

Poziție	**Replică**	**Cod tip godeu**	**Concentrație inițială E2 la cald (nM)**	**Volum E2 la cald (µl)**	**Concentrație finală E2 la cald (nM)**	**Concentrație inițială E2 la rece (µM)**	**Volum E2 la rece (µl)**	**Concentrație finală E2 la rece (µM)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum receptor (µl)**	**Total volum în godeuri**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri

Poziție	Replică	Cod tip godeu	Concentrație inițială E2 la cald (nM)	Volum E2 la cald (µl)	Concentrație finală E2 la cald (nM)	Concentrație inițială E2 la rece (µM)	Volum E2 la rece (µl)	Concentrație finală E2 la rece (µM)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum receptor (µl)	Total volum în godeuri
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri

Poziție	Replică	Cod tip godeu	Concentrație inițială E2 la cald (nM)	Volum E2 la cald (µl)	Concentrație finală E2 la cald (nM)	Concentrație inițială E2 la rece (µM)	Volum E2 la rece (µl)	Concentrație finală E2 la rece (µM)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum receptor (µl)	Total volum în godeuri
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	La cald	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	La cald	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	La cald	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	La cald	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Analiză tipică a saturației [3H]-17β-estradiol cu trei replici de godeuri

Poziție	Replică	Cod tip godeu	Concentrație inițială E2 la cald (nM)	Volum E2 la cald (µl)	Concentrație finală E2 la cald (nM)	Concentrație inițială E2 la rece (µM)	Volum E2 la rece (µl)	Concentrație finală E2 la rece (µM)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum receptor (µl)	Total volum în godeuri
H1	1	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	La cald	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	La cald	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	La cald	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	La cald	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Este de precizat că godeurile „la cald” sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 40 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

▼**M8**

Apendicele 2.3:

CONFIGURAȚIA GODEURILOR ÎN ANALIZA LEGĂRII COMPETITIVE

Placă	**Poziție**	**Replică**	**Tip godeu**	**Cod godeu**	**Codul concentrației**	**Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)**	**Stocul hrER (µl)**	**Volum soluție-tampon (µl)**	**Volum detector (E2 la cald) (µL)**	**Volum din placa de diluție (µL)**	**Volum final (µl)**	**Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)**
S	A1	1	legare totală	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	legare totală	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	legare totală	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	legare totală	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	legare totală	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	legare totală	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A8	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A9	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	A12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1,0 E-06
S	B1	1	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B2	2	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B3	3	E2 la rece	S	S1	2,00 E-07	40	—	40	80	160	1,0 E-07
S	B4	1	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08

▼**M8**

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	B5	2	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08
S	B6	3	E2 la rece	S	S2	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1,0 E-08
S	B7	1	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	B8	2	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	B9	3	E2 la rece	S	S3	6.00E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	B10	1	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	E2 la rece	S	S4	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C2	2	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C3	3	E2 la rece	S	S5	6.00E-10	40	—	40	80	160	3,0 E-10
S	C4	1	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	E2 la rece	S	S6	2,00 E-10	40	—	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11

▼**M8**

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	C9	3	E2 la rece	S	S7	2,00 E-11	40	—	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	soluție săracă	soluție săracă	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	soluție săracă	soluție săracă	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	soluție săracă	soluție săracă	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6.00E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00 E-05	40	—	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6.00E-06	40	—	40	80	160	3,0 E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-07	40		40	80	160	3,0 E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00 E-07	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08

▼**M8**

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-08	40	—	40	80	160	3,0 E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00 E-09	40	—	40	80	160	3,0 E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00 E-03	40	—	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00 E-04	40	—	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00 E-05	40	—	40	80	160	3,0 E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00 E-07	40	—	40	80	160	3,0 E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08

▼**M8**

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Codul concentrației	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00 E-08	40	—	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00 E-09	40	—	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00 E-10	40	—	40	—	160	1.0E-10
S	H1	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	la cald	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	martor tampon	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Este de precizat că godeurile „la cald” sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 40 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

▼M8

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	A1	1	legare totală	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	legare totală	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	legare totală	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	legare totală	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	legare totală	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	legare totală	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S0	2,00 E-06	40	—	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	C1	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Substanța chimică de testat 1	TC1	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼M8

Configurația godeurilor în analiza legării competitive												
Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	E1	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E4	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	7	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Substanța chimică de testat 2	TC2	8	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	1	2,00 E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	2	2,00 E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	3	2,00 E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	4	2,00 E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06

▼**M8**

Configurația godeurilor în analiza legării competitive

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Stocul hrER (µL)	Volum tampon (µL)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	G1	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	5	2,00 E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	6	2,00 E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	7	2,00 E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Substanța chimică de testat 3	TC3	8	2,00 E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1.00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 la rece S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 la rece S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Apendicele 3

ANALIZA LEGĂRII RECEPTORULUI DE ESTROGEN *IN VITRO* A INSTITUTULUI DE EVALUARE ȘI CERCETARE ÎN CHIMIE (CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE - CERI) CARE UTILIZEAZĂ O PROTEINĂ DIN DOMENIUL DE LEGARE PRIN LIGAND RECOMBINANT UMAN

CONSIDERAȚII ȘI LIMITĂRI INIȚIALE (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

1. Această analiză a legării prin saturație și competitive a receptorului de estrogen ERα *in vitro* utilizează un domeniu de legare a ligandului (LBD) al unui ERα uman (hrERα). Această structură proteică a fost realizată de Institutul de cercetare pentru evaluarea substanțelor chimice (Chemicals Evaluation Research Institute - CERI) din Japonia și există sub formă de proteină de fuziune glutation-S-transferază (GST) și este exprimată în *E. coli*. Protocolul CERI a fost supus unui studiu internațional de validare în mai multe laboratoare (2) care a demonstrat relevanța și fiabilitatea acestuia în scopul prevăzut al analizei.

2. Această analiză este o procedură de depistare pentru identificarea substanțelor care pot lega hrERα. Aceasta este utilizată pentru a stabili capacitatea unei substanțe chimice de testat de a concura cu 17β-estradiol pentru legarea de hrERα-LBD. Rezultatele cantitative ale analizei pot include valoarea IC_{50} (un indicator al concentrației unei substanțe chimice de testat care este necesară pentru a desprinde jumătate din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα) și afinitățile de legare relative ale substanțelor chimice de testat pentru hrERα comparativ cu 17β-estradiol. În scopul depistării substanțelor chimice, rezultatele acceptabile ale analizei calitative pot include clasificări ale substanțelor chimice de testat ca lianți ai hrERα, non-lianți sau substanțe echivoce pe baza criteriilor descrise pentru curbele pentru legare.

3. Analiza folosește un ligand radioactiv care necesită obținerea de către laborator a unei licențe pentru materiale radioactive. Toate procedurile cu radioizotopi și substanțe chimice periculoase ar trebui să respecte regulamentele și procedurile descrise în legislația națională.

4. Ar trebui să se parcurgă secțiunile „**INTRODUCERE GENERALĂ**” și „**COMPONENTE ALE ANALIZEI DE LEGARE DE hrER**” înainte de utilizarea acestei analize în scopuri de reglementare. Definițiile și abrevierile utilizate în prezenta orientare privind testarea sunt descrise în apendicele 1.

PRINCIPIILE TESTULUI (A SE VEDEA, DE ASEMENEA, INTRODUCERE GENERALĂ)

5. Analiza legării hrERα măsoară capacitatea unui ligand marcat radioactiv ([^{3}H]17-β-estradiol) de a se lega de ER în prezența concentrațiilor din ce în ce mai mari ale unei substanțe chimice de testat (și anume, concurent). Substanțele chimice de testat care prezintă o afinitate mare pentru ER concurează cu ligandul marcat radioactiv la o concentrație mai mică în comparație cu substanțele chimice care prezintă o afinitate mai redusă pentru receptor.

6. Această analiză cuprinde două componente principale: un experiment de legare prin saturație pentru a caracteriza parametrii de interacțiune receptor-ligand, urmat de un experiment de legare competitiv care caracterizează concurența dintre o substanță chimică de testat și un ligand marcat radioactiv pentru legarea de ER.

▼M8

7. Scopul experimentului de legare prin saturație este de a caracteriza un anumit lot de receptori în ceea ce privește afinitatea de legare și numărul în pregătirea pentru experimentul de legare competitivă. Experimentul de legare prin saturație măsoară, în condiții de echilibru, afinitatea unei concentrații fixe a receptorului de estrogen pentru ligandul său natural (reprezentată de constanta de disociere, Kd) și concentrația locurilor cu receptor activ (Bmax).

8. Experimentul de legare competitivă măsoară afinitatea unei substanțe de a concura cu [^{3}H]17β-estradiol pentru legarea de ER. Afinitatea este cuantificată prin concentrația substanței chimice de testat care, în stare de echilibru, inhibă 50 % din legarea specifică a [^{3}H]17β-estradiol (denumită „concentrație inhibitoare de 50 %” sau IC_{50}). Aceasta poate fi evaluată, de asemenea, utilizând afinitatea de legare relativă (RBA, în raport cu valoarea IC_{50} a estradiolului, măsurată separat în cadrul aceluiași test). Experimentul de legare competitivă măsoară legarea [^{3}H]17β-estradiol la o concentrație fixă în prezența unui interval mare (opt ordine de mărime) de concentrații ale substanței chimice de testat. Datele sunt apoi corelate, dacă este posibil, într-o formă de ecuație Hill (Hill, 1910) care descrie desprinderea ligandului radioactiv de către un liant competitiv dintr-un loc. Gradul de desprindere a estradiolului marcat radioactiv, în stare de echilibru, este folosit pentru a caracteriza substanța chimică de testat ca liant, non-liant sau ca o substanță care generează un răspuns echivoc.

PROCEDURA

Demonstrarea performanței acceptabile a proteinei hrERα

9. Înainte de efectuarea sistematică a analizelor de legare prin saturație și de legare competitivă, ar trebui să se demonstreze performanța corespunzătoare a fiecărui nou lot de hrERα în laboratorul în care acesta va fi utilizat. Pentru a demonstra performanța ar trebui să se utilizeze un proces în două etape. Aceste etape sunt următoarele:

— Se desfășoară o analiză de legare a [^{3}H]-17β-estradiol prin saturație pentru a demonstra specificitatea și saturația hrERα. Analiza regresiei non-liniare a acestor date (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) și schița Scatchard ulterioară ar trebui să documenteze afinitățile de legare de hrERα ale [3H]-17β-estradiol (Kd) și numărul receptorilor (Bmax) pentru un anumit lot de hrERα.

— Se desfășoară o analiză de legare competitivă cu ajutorul substanțelor martor [estrogenul de referință (17β-estradiol), un liant slab (de exemplu, noretinodrel sau noredronă) și un non-liant (octiltrietoxisilan, OTES). Fiecare laborator ar trebui să stabilească o bază de date istorică pentru a documenta consecvența IC50 și valorile relevante pentru estrogenul de referință și liantul slab obținute în urma experimentelor și pentru diferite loturi de hrERα. În plus, parametrii curbelor privind legarea competitivă pentru substanțele martor ar trebui să se încadreze în limitele intervalului de încredere de 95 % (a se vedea tabelul 1), acestea fiind dezvoltate pe baza datelor din laboratoarele care au participat la studiul de validare pentru această analiză (2).

Tabelul 1

Criterii de performanță elaborate pentru estrogenul de referință și liantul slab, analiza CERI privind legarea hrER.

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
17β-estradiol	Partea superioară	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Partea inferioară	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼**M8**

Substanță	Parametru	Media [a]	Abaterea standard (n)	Interval de încredere de 95 % [b]	
				Limita inferioară	Limita superioară
	HillSlope	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	$LogIC_{50}$	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noretinodrel	Partea superioară	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Partea inferioară	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	$LogIC_{50}$	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noretindronă [c]	Partea superioară	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Partea inferioară	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Panta Hill	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	$LogIC_{50}$	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

[a] Media (n) ± abaterea standard (SD) cu mărimea eșantionului (n) au fost calculate utilizând estimările pentru formarea curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în patru laboratoare în timpul studiului de validare (a se vedea anexa N la referința 2).

[b] Intervalele de încredere de 95 % sunt furnizate ca ghid pentru criteriile de acceptabilitate.

[c] Testarea noretindronei a fost opțională pentru sub-sarcina 4 în timpul studiului de validare (a se vedea referința 2, a se vedea sub-sarcina 4). Astfel, media ± SD (n) au fost calculate folosind estimările curbei (ecuația Hill din 4 parametri) pentru testele privind martorii efectuate în două laboratoare.
Intervalul pentru IC_{50} va depinde de valoarea Kd specifică preparatului cu receptori și de concentrația ligandului marcat radioactiv utilizat în cadrul fiecărui laborator. Va fi acceptabilă o ajustare adecvată pentru intervalul IC_{50} în funcție de condițiile utilizate pentru desfășurarea analizei.

Demonstrarea competenței laboratorului

10. A se vedea punctele 17 și 18, precum și tabelul 2 din „**COMPONENTE ALE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA DE hrER**” ale acestei metode de testare. Fiecare analiză (legare prin analiză și legare competitivă) ar trebui să conste în trei testări independente (și anume, cu diluții proaspete de receptor, substanțe chimice și reactivi) în zile diferite și fiecare testare ar trebui să cuprindă trei replici.

Determinarea concentrației receptorului (hrERα)

11. Concentrația receptorului activ variază ușor în funcție de lot și de condițiile de păstrare. Din acest motiv, ar trebui să se determine concentrația receptorului activ, astfel cum a fost primită de la furnizor. Aceasta va determina concentrația corespunzătoare a receptorului activ la momentul testării.

12. În condiții corespunzătoare legării competitive (și anume, 0,5 nM [^{3}H]-estradiol), ar trebui să se incubeze concentrații nominale de 0,1, 0,2, 0,4 și 0,6 nM ale receptorului în absența (legare totală) și prezența (legare nespecifică) unei cantități de 1 μM estradiol neetichetat. Legarea specifică, calculată ca diferență între legarea totală și legarea nespecifică, este schițată în comparație

▼M8

cu concentrația nominală a receptorului. Concentrația receptorului, care determină valorile specifice de legare, reprezentând 40 % din marcajul radioactiv adăugat, este corelată cu concentrația receptorului și această concentrație a receptorului ar trebui utilizate pentru experimente de legare prin saturație și legare competitivă. În mod frecvent, o concentrație hrER finală de 0,2 nM va respecta această condiție.

13. În cazul în care criteriul de 40 % nu poate fi respectat în mod repetat, ar trebui verificat setul experimental pentru identificarea unor posibile erori. Nerespectarea criteriului de 40 % poate indica faptul că există foarte puțini receptori activi în lotul recombinant și ar trebui atunci să se aibă în vedere utilizarea altui lot de receptori.

Analiza saturației

14. Ar trebui să se evalueze opt concentrații din ce în ce mai mari de [^{3}H]17β-estradiol în trei replici, în următoarele trei condiții (a se vedea tabelul 2):

a. în absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în prezența ER. Astfel se determină legarea totală prin măsurarea radioactivității în godeurile care au doar [^{3}H]17β-estradiol.

b. În prezența unei concentrații multiplicate de 2000 de ori de 17β-estradiol nemarcat peste 17β-estradiol marcat și în prezența ER. Intenția acestei condiții este de a satura locurile cu legare activă cu 17β-estradiol nemarcat și, prin măsurarea radioactivității în godeuri, de a determina legarea nespecifică. Orice cantitate de estradiol rămasă la cald, care se poate lega de receptor, se consideră că se leagă într-un loc nespecific, întrucât cantitatea de estradiol rece ar trebui să fie într-o concentrație atât de mare încât să se lege de toate locurile specifice disponibile de pe receptor.

c. În absența substanței 17β-estradiol nemarcate și în absența ER (determinarea radioactivității totale)

Preparatul de [^{3}H]-17β-estradiol, soluții 17β-estradiol nemarcate și hrERα

15. Ar trebui să se prepare o soluție 40 nM de [^{3}H] -17β-estradiol dintr-o soluție mamă de 1 μM de [^{3}H]-17β-estradiol în DMSO, prin adăugarea DMSO (pentru prepararea a 200 nM) și soluție-tampon de analiză la temperatura camerei (pentru a prepara 40 nM). Folosind această soluție de 40 nM, se prepară seria de diluții [^{3}H]-17β-estradiol, variind între 0,313 nM și 40 nM cu soluție-tampon de analiză la temperatura camerei (astfel cum a fost reprezentat pe rândul 12 din tabelul 2). Concentrațiile finale de analiză, cuprinse între 0,0313 și 4,0 nM, se vor obține prin adăugarea a 10 μl din aceste soluții la godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri (a se vedea tabelele 2 și 3). Prepararea soluției tampon de analiză, calcularea soluției mamă inițiale de [^{3}H]-17β-estradiol pe baza activității sale specifice, prepararea diluțiilor și determinarea concentrațiilor sunt descrise în detaliu în protocolul CERI (2).

16. Diluțiile soluțiilor cu 17β-estradiol nemarcate ar trebui să se prepare dintr-o soluție mamă de 1 μM 17β-estradiol prin adăugarea de soluție-tampon de analiză pentru a obține opt concentrații în creștere, cu valori inițiale de la 0,625 μM la 80 μM. Concentrațiile finale de analiză, cuprinse între 0,0625 și 8 μM, se vor obține prin adăugarea a 10 μl din aceste soluții la godeurile de analiză respective de pe o placă de microtitrare cu 96 de godeuri prevăzută pentru măsurarea legării nespecifice (a se vedea tabelele 2 și 3). Prepararea diluțiilor 17β-estradiol nemarcate este descrisă în detaliu în protocolul CERI (2).

▼**M8**

17. Ar trebui să fie utilizată concentrația receptorului care prezintă o legare specifică de 40 ± 10 % (a se vedea punctele 12-13). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată cu soluție-tampon de analiză foarte rece, imediat înainte de utilizare, și anume, după ce au fost preparate toate godeurile pentru legare totală, legare nespecifică și doar ligandul la cald.

18. Plăcile de microtitrare cu 96 de godeuri sunt pregătite astfel cum este ilustrat în tabelul 2, cu trei replici per concentrație de [^{3}H]-17β-estradiol. Distribuirea volumului de [^{3}H]-17β-estradiol, de 17β-estradiol nemarcat, de soluție tampon și de receptor este prezentată în tabelul 3.

Tabelul 2

Distribuția pe placa de microtitrare în cadrul analizei privind legarea prin saturație

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Pentru măsurarea TB			Pentru măsurarea NSB			Doar pentru determinarea ligandului la cald				Diluții E2 nemarcate pentru coloanele 4-6 de pe placă	[^{3}H] Diluții E2 pentru coloanele 1-9 de pe placă
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 µM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 µM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 µM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 µM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 µM E2+ ER			0,125 nM				2,5 µM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 µM E2+ ER			0,250 nM				5 µM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 µM E2+ ER			0,50 nM				10 µM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 µM E2+ ER			1,00 nM				20 µM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 µM E2+ ER			2,00 nM				40 µM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 µM E2+ ER			4,00 nM				80 µM	40 nM

TB: legare totală,
NSB: legare nespecifică
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradiol
E2: 17β-estradiol nemarcat
(*) Concentrațiile indicate aici sunt concentrațiile finale din fiecare godeu.
(**) Diluțiile soluției E2 nemarcate și a [^{3}H]E2 pot fi preparate pe o placă diferită.

▼M8

Tabelul 3

Volume ale reactivilor pentru placa de microtitrare cu saturație

Număr rând		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Etape de preparare		Godeuri TB			Godeuri NSB			Doar ligand la cald		
Volumul componentelor pentru godeurile de reacție de mai sus și ordinea adăugării	Soluție-tampon	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 nemarcat din rândul 11 din tabelul 2	—			10 µl			—		
	[3H]E2 de pe rândul 12 din tabelul 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			—		
Volumul total al reacției		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubație		**REACȚIE DUPĂ INCUBAȚIE DE DOUĂ ORE**						Cuantificarea radioactivității imediat după preparare. Fără incubație		
Tratament cu 0,4 % DCC		Da			Da			**Nr.**		
Volumul DCC 0,4 %		100 µl			100 µl			—		
Filtrare		Da			Da			Nr.		
MĂSURAREA DPMS										
Volumul de cuantificare adăugat la cocteilul de scintilație		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Dacă se utilizează LSC pentru microplăci pentru măsurarea dpms, nu este adecvată doar prepararea ligandului la cald pe aceeași placă de analiză cu godeuri TB și NSB. Doar ligandul la cald ar trebui să fie preparat pe o placă diferită.

(**) Dacă se utilizează centrifugarea pentru separarea DCC, cantitatea de 50 µl de supernatant ar trebui să fie măsurată prin LSC pentru a se evita contaminarea DCC.

19. Plăcile de microtitrare pentru analiză pentru determinarea legării totale și a legării nespecifice ar trebui să fie incubate la temperatura camerei (22 °C-28 °C) timp de două ore.

Măsurarea [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα

20. După perioada de incubație de două ore, [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα ar trebui să fie separat de [^{3}H]-17β-estradiol liber prin adăugarea a 100 µl de suspensie DCC 0,4 % rece ca gheața în godeuri. Plăcile ar trebui apoi să fie plasate pe gheață timp de 10 minute, iar amestecul de reacție și suspensia DCC ar trebui să fie filtrate, prin transferarea într-un filtru al plăcii de microtitrare, pentru eliminarea DCC. Apoi ar trebui să se adauge 100 µl de soluție filtrată în lichidul de scintilație din fiole cu LSC pentru determinarea dezintegrării pe minut (dpms) pe fiolă prin numărare în scintilație lichidă.

▼M8

21. Alternativ, dacă nu este disponibilă un filtru pe microplacă, suspensia DCC poate fi îndepărtată prin centrifugare. Apoi ar trebui să se extragă cu multă atenție o cantitate de 50 µl de supernatant care conține [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα pentru a evita orice contaminare a godeurilor prin atingerea DCC, și care ar trebui să fie utilizată pentru numărare în scintilație.

22. Condiția de unic ligand cald se utilizează pentru determinarea dezintegrării pe minut (dpm) a [^{3}H]-17β-estradiol adăugat în godeurile de analiză. Radioactivitatea ar trebui să fie cuantificată imediat după preparare. Aceste godeuri nu ar trebui să fie incubate și nu ar trebui să fie tratate cu suspensie DCC, dar conținutul lor ar trebui să fie golit direct în lichidul de scintilație. Aceste măsuri demonstrează cât de mult [3H]-17β-estradiol, în DPMS, a fost adăugat în fiecare set de godeuri pentru legarea totală și legarea nespecifică.

Analiza privind legarea competitivă

23. Analiza privind legarea competitivă măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. La fiecare concentrație din cadrul unei testări ar trebui să se utilizeze trei replici concomitent. În plus, pentru fiecare substanță chimică de testat ar trebui să se efectueze trei teste la momente diferite. Substanțele pentru analiză ar trebui să fie configurate pe una sau mai multe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri.

Martori

24. Atunci când se efectuează analiza, ar trebui să se includă în fiecare experiment solventul și martorii tratați în paralel (și anume, estrogenul de referință, liantul slab și non-liantul). Pe fiecare placă, în timpul fiecărei testări, ar trebui să se utilizeze curbe complete de concentrații pentru estrogenul de referință și martori (și anume, liant slab și non-liant). Toate celelalte plăci ar trebui să conțină (i) E2 și un liant slab în trei replici la o concentrație ridicată (desprindere maximă, și anume, desprindere aproximativ integrală a ligandului marcat radioactiv) și medie (aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent și legare nespecifică, fiecare în trei replici. Procedurile pentru prepararea soluției-tampon de analiză, [^{3}H]-17β-estradiol, hrERα și a soluțiilor cu substanță chimică de testat sunt descrise detaliat în protocolul CERI (2).

Martor tratat cu solvent:

25. Martorul tratat cu solvent indică faptul că solventul nu interacționează cu sistemul de testare și, de asemenea, măsoară legarea totală (TB). Solventul preferat este DMSO. În mod alternativ, în cazul în care cea mai mare concentrație a substanței chimice de testat nu este solubilă în DMSO, poate fi utilizat etanol. Concentrația DMSO în godeurile de analiză finale ar trebui să fie de 2,05 % și ar putea fi mărită până la 2,5 % în cazul în care substanța chimică de testat este lipsită de solubilitate. Nu ar trebui să se utilizeze concentrații DMSO peste 2,5 % din cauza interferenței unor concentrații mai mari de solvenți cu analiza. Pentru substanțele chimice de testat care nu sunt solubile în DMSO, dar sunt solubile în etanol, se poate utiliza o soluție de maxim 2 % etanol în analiză, fără interferențe.

Martor tampon:

26. Martorul tampon (BC) nu ar trebui să conțină nici solvent, nici substanță chimică de testat, ci toate celelalte componente ale analizei. Rezultatele martorului tampon sunt comparate cu martorul tratat cu solvent pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză.

▼M8

Liant puternic (estrogen de referință)

27. 17β-estradiol (CAS 50-28-2) este ligandul endogen și se leagă cu un grad de afinitate mare de ER, subtipul alfa. Pentru fiecare analiză privind legarea competitivă hrERα ar trebui să se pregătească o curbă standard utilizând 17β-estradiol nemarcat pentru a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp, în același laborator. Ar trebui să se prepare opt soluții de 17β-estradiol nemarcat în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză vor fi utilizate pentru curba standard , cu următoarea repartizare: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Cea mai mare concentrație de 17β-estradiol nemarcat (1 μM) ar trebui să servească drept indicator al legării nespecifice. Această concentrație se distinge prin eticheta „NSB” în tabelul 4, chiar dacă aceasta este, de asemenea, integrată în curba standard.

Liant slab

28. Un liant slab [noretinodrel (CAS 68-23-5) sau, ca alternativă, noretindronă (CAS 68-22-40] ar trebui să fie inclus pentru a demonstra sensibilitatea fiecărui experiment și a permite o evaluare a variabilității atunci când analiza este efectuată în timp. Ar trebui să se prepare opt soluții de liant slab în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză fiind următoarele: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} și 10^{-9} M.

Non-liant

29. Ca martor negativ ar trebui să se utilizeze octiltrietoxisilan (OTES, CAS 2943-75-1) (non-liant). Acesta asigură faptul că, așa cum este efectuată analiza, aceasta va detecta substanțele chimice de testat care nu se leagă de hrERα. Ar trebui să se prepare opt soluții de non-liant în DMSO și în soluția-tampon de analiză, iar concentrațiile finale din godeurile de analiză fiind următoarele: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Ftalatul de di-n-butil (DBP, CAS 84-72-2) poate fi utilizat ca non-liant alternativ, însă poate fi testat doar la maxim 10^{-4}M. S-a demonstrat că solubilitatea maximă a DBP în cadrul analizei este 10^{-4}M.

Concentrația hrERα

30. Ar trebui să fie utilizată cantitatea de receptori care prezintă o legare specifică de 40 ± 10 % (a se vedea punctele 12-13 din apendicele 3). Soluția hrERα ar trebui să fie preparată prin diluția hrERα funcțional în soluție-tampon de analiză rece ca gheața, imediat înainte de utilizare.

[^{3}H]-17β-estradiol

31. Concentrația [^{3}H]-17β-estradiol finală în godeurile de analiză ar trebui să fie de 0,5 nM.

Substanțe chimice de testat

32. În primul rând, trebuie să se efectueze un test al solubilității pentru a determina limita de solubilitate pentru fiecare substanță chimică de testat și pentru a identifica intervalul de concentrații adecvat care să fie utilizat la efectuarea protocolului de testare. Limita de solubilitate a fiecărei substanțe chimice de testat va fi determinată inițial în solvent și confirmată ulterior în condiții de testare. Concentrația finală testată în cadrul analizei nu ar trebui să depășească 1 mM. Testul pentru identificarea intervalului cuprinde un martor tratat cu solvent și diluții în serie de cel puțin 8 log, pornind de la concentrația maximă acceptabilă (de exemplu, cel mult 1 mM, în funcție de limita de solubilitate), și se consemnează gradul de tulburare sau precipitatul (a se vedea, de asemenea, punctul 35 din apendicele 3). După ce se determină intervalul de concentrații pentru testare, o substanță chimică de testat ar trebui să fie testată folosind concentrații de 8 log repartizate în mod corespunzător, astfel cum este definit în testul preliminar de

▼M8

stabilire a intervalului. Concentrațiile testate în cel de-al doilea și cel de-al treilea experiment ar trebui să fie apoi ajustate după caz pentru o mai bună caracterizare a curbei concentrație-răspuns, dacă este necesar.

33. Diluțiile substanței chimice de testat ar trebui să fie preparate în solvent adecvat (a se vedea punctul 25 din apendicele 3). În cazul în care concentrația maximă a substanței chimice de testat nu este solubilă nici în DMSO, nici în etanol, iar dacă se adaugă mai mult solvent, concentrația solventului în eprubeta finală ar fi mai mare decât limita acceptabilă, concentrația maximă poate fi redusă la următoarea concentrație inferioară. În acest caz, se poate adăuga o concentrație suplimentară la limita inferioară a seriei de concentrații. Alte concentrări din cadrul seriei ar trebui să rămână neschimbate.

34. Soluțiile cu substanță chimică de testat ar trebui să fie monitorizate atent atunci când se adaugă la godeul de analiză, deoarece substanța chimică testată se poate precipita atunci când este adăugată în acesta. Datele pentru toate godeurile care conțin precipitat ar trebui să fie excluse de la formarea curbei, iar motivul excluderii datelor ar trebui să fie consemnat.

35. În cazul în care există informații anterioare din alte surse care furnizează o valoare log(IC_{50}) pentru o substanță chimică de testat, ar putea fi adecvat ca diluțiile să se repartizate geometric mai apropiate, în jurul valorii preconizate log(IC_{50}) (și anume, 0,5 unități de log). Rezultatele finale ar trebui să reflecte o marjă suficientă de concentrații pe fiecare parte a valorii log(IC50), inclusiv pe partea superioară și cea inferioară, astfel încât curba pentru legătură să poată fi caracterizată în mod corespunzător.

Organizara plăcii de analiză

36. Ar trebui să se pregătească plăci de microtitrare etichetate utilizând incubații în șase replici pentru martorul tratat cu solvent, cea mai mare concentrație a estrogenului de referință (E2), care constituie, de asemenea, un indicator al legăturii nespecifice (NSB), soluția-tampon martor și incubații în trei replici pentru fiecare dintre cele opt concentrații ale martorului non-liant (octiltrietoxisilan), cele șapte concentrații inferioare pentru estrogenul de referință (E2), cele opt concentrații ale liantului slab (noretinodrel sau noretindronă) și cele opt concentrații ale fiecărei substanțe chimice de testat (TC). În tabelul 4 de mai jos este prezentat un exemplu de model de diagramă a plăcii pentru curbele de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori. Se utilizează plăci de microtitrare suplimentare pentru substanța chimică de testat, care ar trebui să includă martori pe placă [și anume, (i) E2 și un liant slab în trei replici având o concentrație ridicată (desprindere maximă) și medie (de aproximativ IC_{50}); (ii) martor tratat cu solvent (ca legare totală) și soluție de legare nespecifică, fiecare în șase replici (tabelul 5). În apendicele 3.3 este prezentat un exemplu de fișă de configurare a plăcilor de microtitrare pentru analiză competitivă, care utilizează trei substanțe chimice de testat necunoscute. Concentrațiile indicate în fișa de lucru, precum și în tabelele 4 și 5 se referă la concentrațiile finale utilizate în fiecare godeu de analiză. Concentrația maximă pentru E2 ar trebui să fie 1×10^{-7} M, iar pentru liantul slab, ar trebui să se utilizeze cea mai mare concentrație utilizată pentru liantul slab pe placa 1. Concentrația IC_{50} trebuie să fie stabilită de laborator pe baza bazei sale de date cu martori testați anterior. Se preconizează că această valoare va fi similară cu cea observată în studiile de validare (a se vedea tabelul 1).

▼M8

Tabelul 4

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare [1], [2] curbe de concentrație complete pentru estrogenul de referință și martori (placa 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Martor tampon și martor pozitiv (E2)			Slab pozitiv (noretinodrel)			Martor negativ (OTES)			TB și NSB		
A	Soluție săracă (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (martor tratat cu solvent) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Martor tampon		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Soluție săracă (pentru mediu la cald) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Eșantion constituit pentru placa de microtitrare standard pentru a fi analizată în cadrul fiecărui experiment.
([2]) Este de precizat că această placă de microtitrare se aranjează utilizând diluțiile efectuate pe placa de diluții descrisă pentru standardele din secțiunile anterioare.
În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)
(*) soluție săracă reală, godeul nu este utilizat
(**) soluția săracă nu a fost utilizată în timpul incubației, ci pentru a confirma radioactivitatea totală adăugată.

Tabelul 5

Configurația pentru analiza privind legarea competitivă pe placa de microtitrare, plăci suplimentare pentru substanțele chimice de testat (TC) și martorii de pe placă.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Substanța chimică de testat-1 (TC-1)			Substanța chimică de testat-2 (TC-2)			Substanța chimică de testat-3 (TC-3)			Martori		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 ($1 \times 10_{-7}$M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10_{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Martor tratat cu solvent)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

În acest exemplu, liantul slab este noretinodrel (NE)

▼M8

Încheierea analizei privind legarea competitivă

37. Cu excepția godeurilor pentru legare totală și soluții sărace (pentru medii calde), astfel cum se arată în tabelul 6, 50 µl de soluție-tampon de analiză ar trebui să se introducă în fiecare godeu și să se amestece cu 10 µl de martor tratat cu solvent, estrogen de referință (E2), liant slab, non-liant și, respectiv, substanțe chimice de testat, respectiv 10 µl de soluție [3H]-17β-estradiol de 5 nM. Apoi o cantitate de 30 µl de soluție receptoare rece ca gheața a fost adăugată în fiecare placă și amestecată ușor. Soluția hrERα ar trebui să fie ultimul reactiv de adăugat. Plăcile de microtitrare de analiză ar trebui să fie incubate la temperatura camerei (22°-28 °C) timp de 2 ore.

Tabelul 6

Volumul componentelor de analiză pentru testul privind legarea competitivă hrER, plăci de microtitrare

Etape de preparare		Altele decât godeurile TB	Godeuri TB	Soluție săracă (pentru mediu cald)
Volumul componentelor pentru godeurile de reacție de mai sus și ordinea adăugării	Soluție-tampon de analiză la temperatura camerei	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 nemarcat, liant slab, non-liant, solvent și substanțe chimice de testat (*)	10 µl	–	–
	[3H]-17β-estradiol pentru a produce o concentrație finală de 0,5 nM (adică 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	concentrația hrERα astfel cum este determinată (a se vedea punctele 12-13)	30 µl	30 µl	—
Volumul total în fiecare godeu de analiză		100 µl	100 µl	100 µl

(*) preparat corespunzător pentru a obține concentrația finală în limitele de concentrație acceptabile ale solventului

38. Cuantificarea legării [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, în urma separării [^{3}H]-17β-estradiol legat de hrERα de [^{3}H]-17β-estradiol liber, prin adăugarea, în fiecare godeu, a 100 µl de suspensie DCC rece ca gheața, ar trebui să fie efectuată astfel cum este descris la punctele 21-23 din apendicele 3 pentru analiza privind legarea prin saturație.

39. Godeurile G10-12 și H10-12 [identificate ca având soluție săracă (pentru mediu cald) în tabelul 4] reprezintă DPMS al [3H]-estradiol marcat în 10 µl. Partea alicotă de 10 µl ar trebui să fie introdusă direct în lichidul de scintilație.

Criterii de acceptabilitate

Analiza privind legarea prin saturație

40. Curba specifică privind legarea ar trebui să ajungă la un platou, întrucât au fost utilizate concentrații crescătoare de [^{3}H]-17β-estradiol, care indică saturația hrERα cu ligandul.

41. Legarea specifică la 0,5 nM de [^{3}H]-17β-estestradiol ar trebui să fie situată în intervalul acceptabil 30 %-50 % din radioactivitatea totală măsurată medie adăugată de la o testare la alta. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine, iar analiza saturației ar trebui să fie repetată.

▼M8

42. Datele ar trebui să producă o reprezentare grafică liniară Scatchard.

43. Legarea nespecifică nu ar trebui să fie excesivă. Valoarea pentru legarea nespecifică ar trebui, de regulă, să fie < 35 % din legarea totală. Însă, raportul poate depăși ocazional această limită atunci când se măsoară valoarea dpm foarte scăzută pentru concentrația minimă a substanței 17β-estradiol marcat radioactiv testate.

Analiza privind legarea competitivă

44. Concentrațiile din ce în ce mai mari de 17β-estradiol nemarcat ar trebui să desprindă [^{3}H]-17β-estradiol de receptor într-un mod compatibil cu o legarea competitivă dintr-un singur punct.

45. Valoarea IC_{50} pentru estrogenul de referință (și anume, 17β-estradiol) ar trebui să fie aproximativ egal cu concentrația molară a [^{3}H]-17β-estradiol, plus valorile Kd determinate din analiza privind legarea prin saturație.

46. Legarea specifică totală ar trebui să se situeze în mod consecvent în intervalul acceptabil de 40 ± 10 % atunci când concentrația medie măsurată a radioactivității totale adăugate în fiecare godeu a fost de 0,5 nM în toate testele. Abaterile ocazionale ușoare de la acest interval sunt acceptabile, însă, dacă testele se situează în mod constant în afara acestui interval sau un anumit test este semnificativ în afara acestui interval, ar trebui să se ajusteze concentrația de proteine.

47. Solventul nu ar trebui să modifice sensibilitatea sau reproductibilitatea analizei. Rezultatele martorului tratat cu solvent (godeuri TB) sunt comparate cu martorul tampon pentru a verifica dacă solventul utilizat nu afectează sistemul de analiză. Rezultatele pentru TB și martorul tampon ar trebui să fie comparabile în cazul în care nu există niciun efect al solventului asupra analizei.

48. Non-liantul nu ar trebui să desprindă mai mult de 25 % din [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα atunci când se testează maxim 10^{-3} M (OTES) sau 10^{-4} M (DBP).

49. Au fost elaborate criterii de performanță pentru estrogenul de referință și doi lianți slabi (de exemplu, noretinodrel, noretindronă), utilizând date din studiul de validare a analizei CERI privind legarea hrER (anexa N la referința 2). Sunt prezentate intervale de încredere de 95 % pentru medie +/- SD (n) pentru toate testele pe martori din cadrul celor patru laboratoare care au participat la studiul de validare. Au fost calculate intervale de încredere de 95 % pentru parametrii de formare a curbei (și anume, partea superioară, partea inferioară, Hillslope și logIC_{50}) pentru estrogenul de referință și lianții slabi, precum și pentru valoarea log_{10}RBA a lianților slabi în raport cu estrogenul de referință. Tabelul 1 furnizează intervalele preconizate pentru parametrii de formare a curbei care pot fi utilizați ca și criterii de performanță. În practică, intervalul IC_{50} poate varia ușor, în funcție de valoarea Kd derivată experimental a preparatul cu receptori și de concentrația ligandului utilizaztă pentru analiză.

50. Nu au fost elaborate criterii de performanță pentru parametrii de formare a curbei în cazul substanțelor chimice de testat din cauza gamei largi de substanțe chimice de testat posibile și a variației posibilelor afinități și rezultatele (de exemplu, curbă completă, curbă parțială, fără formă de curbă). Însă, la analizarea rezultatelor din cadrul fiecărei testări, în cazul unei substanțe chimice de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională. Ar trebui să se utilizeze un interval suficient de concentrații ale substanței chimice de testat pentru a defini cu claritate partea superioară (de exemplu, o

▼M8

legare de 90-100 %) a curbei de legare competitivă. Variabilitatea între replici la fiecare concentrație a substanței chimice de testat, precum și între cele trei teste independente ar trebui să fie rezonabilă și justificată din punct de vedere științific. Martorii din cadrul fiecărei serii, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se apropie de măsurile de performanță raportate pentru această analiză FW și să fie în concordanță cu datele privind martorii testați anterior din fiecare laborator.

ANALIZA DATELOR

Analiza privind legarea prin saturație

51. Se măsoară atât legarea totală, cât și cea nespecifică. Pornind de la aceste valori, se calculează legarea specifică a [^{3}H]-17β-estradiol, în condiții de echilibru, la concentrații în creștere, scăzând valoarea legării nespecifice din total. Un grafic al legării specifice versus concentrația [^{3}H]-17β-estradiol ar trebui să ajungă al un platou pentru o legare specifică maximă care indică o saturație a hrERα cu [^{3}H]-17β-estradiol. În plus, analiza datelor ar trebui să documenteze legarea [^{3}H]-17β- estradiol de un singur loc de legare cu un grad ridicat de afinitate. Legarea nespecifică, cea totală și cea specifică ar trebui să fie ilustrate pe o curbă de legare prin saturație. În cadrul unei analize ulterioare a acestor date ar trebui să se utilizeze o analiză de regresie neliniară (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) cu o reprezentare finală a datelor sub forma unui grafic Scatchard.

52. Prin analiza datelor ar trebui să se determine valorile Bmax și Kd doar din datele privind legarea totală, pe baza ipotezei că legarea nespecifică este liniară, cu excepția cazului în care se justifică utilizarea unei metode diferite. În plus, ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Ar trebui să se recurgă întotdeauna la corecția pentru sărăcirea ligandului (de exemplu, utilizând metoda lui Swillens, 1995) atunci când se determină valorile Bmax și Kd din datele privind legarea prin saturație.

Analiza privind legarea competitivă

53. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

54. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC_{50}) ar trebui, în general, să rămână necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Nu ar trebui să se recurgă la corecția pentru sărăcirea ligandului. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab ar trebui să se calculeze ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele martorilor pozitivi și ale martorului non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând valorile de măsurare a performanței analizei de la punctele 44-49 din prezentul apendice 3.

▼M8

55. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Se recomandă ca fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori (a se vedea punctul 54 din prezentul apendice 3). După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]-17β-estradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător.

Interpretarea datelor

56. Cu condiția ca toate criteriile de acceptabilitate să fie îndeplinite, o substanță chimică de testat este considerată a fi un liant pentru hrERα în cazul în care poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns în intervalul de date este sub 50 % (figura 1).

57. Cu condiția îndeplinirii tuturor criteriilor de acceptabilitate, o substanță chimică de testat este considerată a fi un non-liant pentru hrERα dacă:

— poate fi formată o curbă de legare, iar punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată, situat în intervalul de date, este mai mare de 75 % sau

— nu poate fi formată o curbă de legare, iar media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.

58. Substanțele chimice de testat sunt considerate echivoce dacă nu este îndeplinită niciuna dintre condițiile de mai sus (de exemplu, punctul cel mai de jos de pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

Tabelul 7

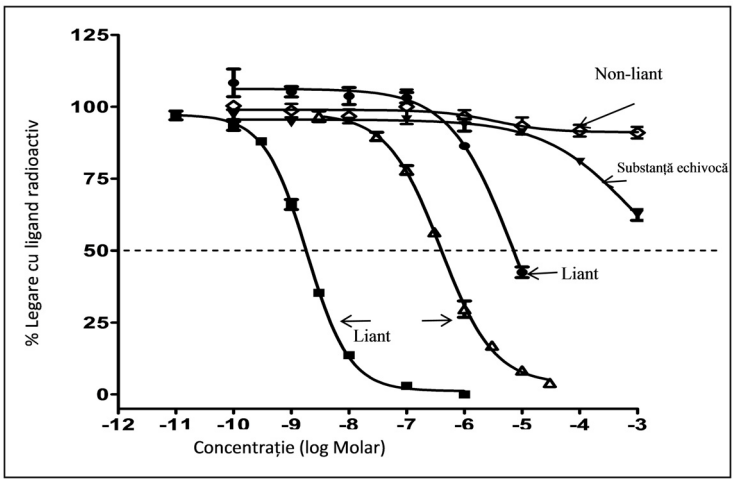
Criterii pentru clasificare pe baza curbei de legare competitive pentru o substanță chimică de testat.

Clasificare	Criterii
Liant[a]	Se poate forma o curbă de legare. **Punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este mai mic de 50 %.**
Non-liant[b]	Dacă se poate forma o curbă de legare, **punctul cel mai de jos al curbei de răspuns în intervalul de date este peste 75 %.** Dacă nu se poate forma o curbă de legare, **media cea mai scăzută a procentului de legare neuniformizată între grupurile de concentrații în ceea ce privește datele este mai mare de 75 %.**
Substanță echivocă[c]	Orice substanță care poate fi testată și care nu este nici liant, nici non-liant de exemplu, punctul cel mai de jos pe curba de răspuns formată este între 76 și 51 %).

▼M8

Figura 1

Exemple de clasificare a unei substanțe chimice de testat utilizând curba de legare competitivă.



59. Se combină mai multe testări realizate într-un laborator pentru o substanță chimică de testat prin atribuirea de valori numerice fiecărei testări și calcularea mediei testelor, astfel cum se arată în tabelul 8. Rezultatele pentru testele combinate din fiecare laborator sunt comparate cu clasificarea preconizată pentru fiecare substanță chimică de testat.

Tabelul 8

Metoda de clasificare a substanței chimice de testat utilizând teste multiple în cadrul unui laborator

Pentru atribuirea unei valori fiecărei testări:

Clasificare	**Valoare numerică**
Liant	2
Substanță echivocă	1
Non-liant	0

Pentru clasificarea mediei valorilor numerice ale testelor:

Clasificare	**Valoare numerică**
Liant	Media ≥ 1,5
Substanță echivocă	0,5 ≤ media < 1,5
Non-liant	Media < 0,5

RAPORTUL TESTULUI

60. A se vedea punctul 24 din „COMPONENTELE ANALIZEI PRIVIND LEGAREA hrER” din prezenta metodă de testare.

▼**M8**

Apendicele 3.1

Listă de Termeni

[^{3}H]E2: 17β-estradiol marcat radioactiv cu tritiu

DCC: Cărbune acoperit cu dextran

E2: 17β-estradiol nemarcat (inert)

Soluția-tampon de analiză: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, conținând 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % Glycerol, 0,2 mM Leupeptin, 1 mM Dithiothreitol și 10 mg/ml albumină serică bovină

hrERα: Receptor de estrogen recombinant uman alfa (domeniu de legare cu ligand)

Replică: Unul dintre multiplele godeuri care conțin același conținut la aceleași concentrații și sunt analizate în paralel în cadrul unei singure testări. În acest protocol, fiecare concentrație a substanței chimice de testat este testată în trei replici; cu alte cuvinte, există trei replici care sunt testate simultan la fiecare concentrație a substanței chimice de testat.

Testare: Un set complet de godeuri de pe o placă de microtitrare testate în paralel, care oferă toate informațiile necesare pentru a caracteriza legarea unei substanțe chimice de testat de hrERα (și anume, [^{3}H]-17β-estradiol total adăugat în godeul de analiză, legarea maximă a [^{3}H]-17β-estradiol de hrERα, legarea nespecifică și legarea totală la diferite concentrații ale substanței chimice de testat). O testare ar putea consta dintr-un singur godeu de analiză (și anume, replică) per concentrație, dar, deoarece acest protocol impune efectuarea analizei pe trei replici, o testare constă din trei godeuri de analiză per concentrație. În plus, acest protocol necesită trei teste independente (și anume, neefectuate în paralel) pe substanță chimică.

▼M8

Apendicele 3.2

CONFIGURAȚIA GODEURILOR ÎN ANALIZA LEGĂRII COMPETITIVE

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	A1	1	Soluție săracă	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Soluție săracă	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Soluție săracă	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	E2 la rece	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	E2 la rece	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10
S	D2	2	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10
S	D3	3	E2 la rece	S	S3	3,16 E-09	30	50	10	10	100	3,2 E-10
S	E1	1	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	E2 la rece	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	F2	2	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	F3	3	E2 la rece	S	S5	3,16 E-08	30	50	10	10	100	3,2 E-09
S	G1	1	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	G2	2	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	E2 la rece	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	E2 la rece	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16 E-07	30	50	10	10	100	3,2 E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16 E-06	30	50	10	10	100	3,2 E-07

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16 E-05	30	50	10	10	100	3,2 E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16 E-04	30	50	10	10	100	3,2 E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8 DBP7	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	legare totală	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	legare totală	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	legare totală	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	legare totală	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	legare totală	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	legare totală	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	E2 la rece (ridicat)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	D11	5	E2 la rece (ridicat)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	E2 la rece (ridicat)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Martor tampon	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Martor tampon	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Martor tampon	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Martor tampon	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Martor tampon	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
S	H11 (*)	5	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Soluție săracă (pentru mediu cald)	La cald	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Necunoscut 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Necunoscut 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Necunoscut 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Necunoscut 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Necunoscut 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Necunoscut 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Necunoscut 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	H3	3	Necunoscut 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Necunoscut 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Necunoscut 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Necunoscut 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Necunoscut 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Necunoscut 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Necunoscut 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Necunoscut 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Necunoscut 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	A9	3	Necunoscut 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Necunoscut 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Necunoscut 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Necunoscut 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Necunoscut 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Necunoscut 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Necunoscut 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Necunoscut 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Martor E2 (max)	S	E2 max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Martor E2 (max)	S	E2 max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Martor E2 (max)	S	E2 max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Martor E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	B11	2	Martor E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Martor E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Martor NE (max)	S	Nemax1	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C11	2	Martor NE (max)	S	Nemax2	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	C12	3	Martor NE (max)	S	Nemax3	1.00E-3,5	30	50	10	10	100	1.00E-4,5
P1	D10	1	Martor NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Martor NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Martor NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	E2 la rece (ridicat)	NSB	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	E2 la rece (ridicat)	NSB	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	E2 la rece (ridicat)	NSB	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	E2 la rece (ridicat)	NSB	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	E2 la rece (ridicat)	NSB	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	E2 la rece (ridicat)	NSB	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	legare totală	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	legare totală	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	legare totală	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼M8

Placă	Poziție	Replică	Tip godeu	Cod godeu	Cod concentrație	Concentrația inițială a soluției testate în paralel (M)	Soluție mamă hrER (µl)	Volum soluție-tampon (µl)	Volum detector (E2 la cald) (µL)	Volum din placa de diluție (µL)	Volum final (µl)	Concentrația finală a soluției testate în paralel (M)
P1	H10	4	legare totală	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	legare totală	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	legare totală	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	-

(*) Este de precizat că godeurile „la cald” sunt goale în timpul incubației. Cantitatea de 10 µl se adaugă doar pentru numărarea scintilației.

▼M8

Apendicele 4

CONSIDERAȚII PENTRU ANALIZA DATELOR DIN ANALIZA PRIVIND LEGAREA COMPETITIVĂ HREH

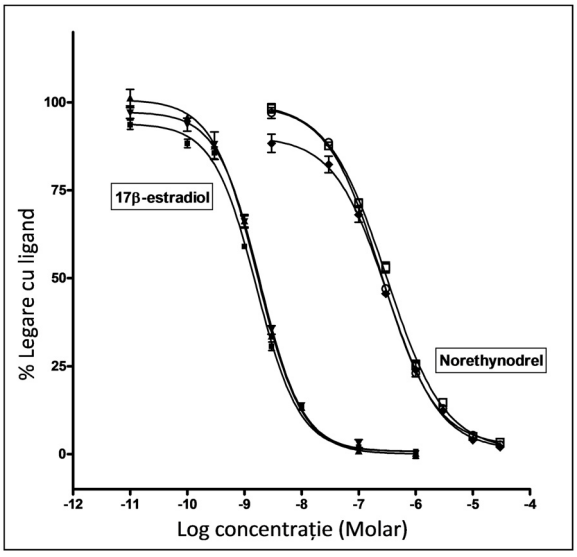
1. Analiza privind legarea competitivă hrERα măsoară gradul de legare al unei singure concentrații de [^{3}H]-17β-estradiol în prezența unor concentrații în creștere ale unei substanțe chimice de testat. Curba de legare competitivă este reprezentată grafic ca fiind o legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol versus concentrația (unități de log10) soluției testate în paralel. Concentrația substanței chimice de testat care inhibă 50 % din legarea specifică maximă a [^{3}H]-17β-estradiol constituie valoarea IC_{50}.

Analiza datelor pentru estrogenul de referință și liantul slab (1)

2. Datele din testele pe martori se transformă (adică procentul de legare specifică [^{3}H]-17β-estradiol și concentrația log a substanței chimice martor) în vederea unei analize ulterioare. Estimările valorilor log(IC_{50}) pentru martorii pozitivi (de exemplu, estrogenul de referință și liantul slab) ar trebui să fie determinate utilizând un software de formare a curbelor neliniare adecvat pentru a se încadra într-o ecuație Hill cu patru parametri (de exemplu, BioSoft; GraphPad Prism) (2). Partea superioară, cea inferioară, panta și log(IC50) poate să rămână, de regulă, necondiționate atunci când se formează aceste curbe. Ar trebui să se utilizeze o regresie robustă atunci când se determină cea mai bună corelare, cu excepția cazului în care este furnizată o justificare. Ar trebui să se precizeze metoda aleasă pentru regresia robustă. Corecția pentru sărăcirea ligandului nu a fost necesară pentru analizele FW sau CERI hrER, dar poate fi avută în vedere dacă este necesar. În urma analizei inițiale, ar trebui să se examineze fiecare curbă de legare pentru a asigura o corelare corespunzătoare cu modelul. Afinitatea de legare relativă (RBA) a unui liant slab poate fi calculată ca procent din log (IC_{50}) pentru liantul slab raportat la valoarea log (IC_{50}) pentru 17β-estradiol. Rezultatele pentru martorii pozitivi și pentru martorul non-liant ar trebui să fie evaluate utilizând măsuri ale performanței analizei și criterii de acceptabilitate, astfel cum sunt descrise în prezenta metodă de testare (punctul 20), apendicele 2 (analiza FW, punctele 41-51) și apendicele 3 (analiza CERI, punctele 41-51). În figura 1 sunt prezentate exemple de trei teste pentru estrogenul de referință și liantul slab.

Figura 1

Exemple de curbe de legare competitivă pentru estrogenul de referință și liantul slab martor



▼M8

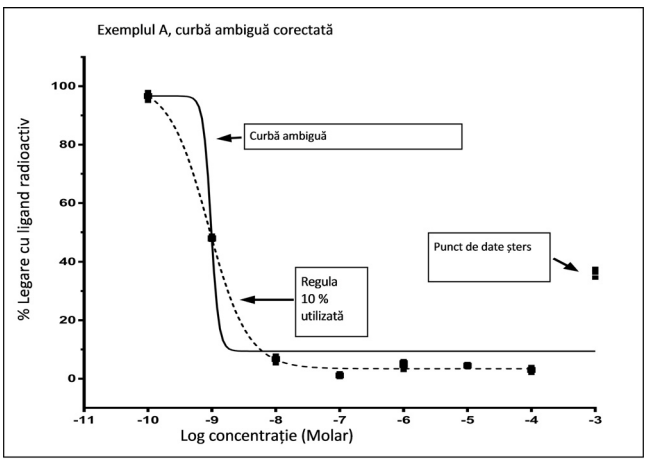
Analiza datelor pentru substanțele chimice de testat

3. Datele pentru toate substanțele chimice de testat ar trebui să fie analizate printr-o abordare etapizată pentru a se asigura analizarea corespunzătoare a datelor și clasificarea corectă a fiecărei curbe de legare competitivă. Fiecare testare pentru o substanță chimică de testat să fie supusă inițial unei analize a datelor standardizată care este identică cu cea utilizată pentru estrogenul de referință și lianții slabi martori. După încheierea analizei, ar trebui să fie efectuată o analiză tehnică a parametrilor curbei și o verificare vizuală a modului în care datele se încadrează pe curba de legare competitivă generată pentru fiecare testare. În timpul acestei analize tehnice, observațiile privind o scădere dependentă de concentrație în procentul [^{3}H]-17β-estradiol legat în mod specific, variabilitatea scăzută între replicile tehnice la fiecare concentrație chimică și consecvența parametrilor de corelare între cele trei teste constituie indicații bune pentru faptul că analiza și analizele datelor au fost efectuate în mod corespunzător. La examinarea rezultatelor fiecărui test, pentru o substanță chimică de testat, ar trebui să se aplice o apreciere profesională, iar datele utilizate pentru a clasifica fiecare substanță chimică de testat ca liant sau non-liant ar trebui să fie justificabile din punct de vedere științific.

4. Ocazional, ar putea exista exemple de date care necesită o atenție suplimentară pentru a analiza și a interpreta în mod corespunzător datele privind legarea hrER. Există studii anterioare care au arătat cazuri în care analiza și interpretarea datelor privind legarea competitivă de receptori pot fi complicate de o creștere a valorii procentuale a legării specifice atunci când se testează substanțe chimice la cele mai mari concentrații (figura 2). Aceasta este o problemă bine-cunoscută care a fost întâlnită atunci când au fost utilizate protocoale pentru o serie de analize privind legarea competitivă de receptori (3). În aceste cazuri, se observă un răspuns dependent de concentrație la concentrații mai mici, dar deoarece concentrația substanței chimice de testat se apropie de limita solubilității, gradul de desprindere a [^{3}H]17β-estradiol nu mai scade. În aceste cazuri, datele pentru concentrațiile mai mari indică faptul că s-a atins limita biologică a analizei. De exemplu, acest fenomen este asociat de multe ori cu insolubilitatea substanței chimice și precipitarea la concentrații ridicate sau poate fi, de asemenea, o reflectare a depășirii capacității cărbunelui acoperit cu dextran de a prinde ligandul marcat radioactiv nelegat în timpul procedurii de separare la cele mai mari concentrații chimice. Includerea unor astfel de puncte de date atunci când se înregistrează datele privind legarea competitivă pe o curbă sigmoidă poate conduce uneori la o clasificare eronată a potențialului de legătură de ER în cazul unei substanțe chimice de testat (figura 2). Pentru a evita acest lucru, protocolul pentru analizele FW și CERI privind legarea de hrER include o opțiune de a exclude din analize punctele de date în cazul în care media replicilor pentru legarea procentuală specifică a [^{3}H]17β-estradiol este de cel puțin 10 %, peste media observată la o concentrație mai mică (și anume, aceasta este denumită regula de 10 %). Această regulă poate fi folosită o singură dată pentru o anumită curbă și trebuie să existe date care rămân pentru cel puțin 6 concentrații, astfel încât curba să poată fi corect clasificată.

Figura 2

Exemple, curbe privind legarea competitivă cu și fără utilizarea regulii de 10 %.

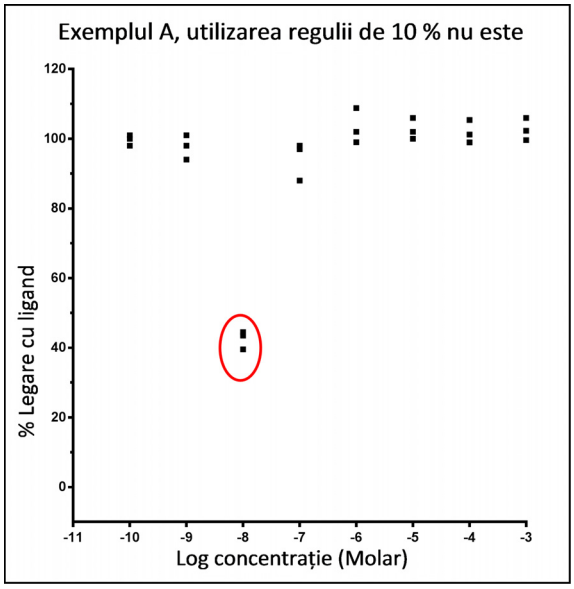


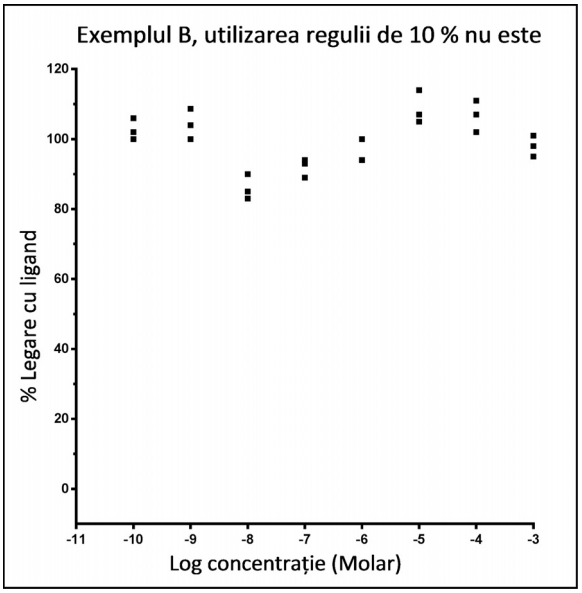
▼**M8**

5. Utilizarea adecvată a regulii de 10 % pentru a corecta aceste curbe ar trebui să fie analizată cu atenție și rezervată pentru cazurile în care există o indicație clară a unui liant al hrER. În cursul desfășurării experimentelor pentru studiul de validare a analizei FW privind legarea de hrER, s-a observat că, uneori, regula de 10 % a avut o consecință neintenționată și neprevăzută. Substanțele chimice care nu au interacționat cu receptorul (și anume, non-lianți reali) au prezentat adesea o variabilitate de aproximativ 100 % în legarea ligandului radioactiv, care a depășit 10 % în intervalul de concentrații testate. În cazul în care valoarea cea mai scăzută s-a întâmplat să fie la un nivel redus de concentrare, datele privind toate concentrațiile mai mari ar putea fi eliminate din analiză prin utilizarea regulii de 10 %, chiar dacă aceste concentrări ar putea fi utile în stabilirea statutului de non-liant al substanței chimice. Figura 3 prezintă exemple în care utilizarea regulii de 10 % nu este adecvată.

Figura 3

Exemple, date privind legarea competitivă în cazul cărora utilizarea regulii de 10 % nu este adecvată.





▼**M8**

Referințe

(1) OCDE (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 226), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Motulsky H. și Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. TESTELE *IN VITRO* PRIVIND SENSIBILIZAREA CUTANATĂ, CARE ABORDEAZĂ EVENIMENTUL IMPORTANT PRIVIND ACTIVAREA CELULELOR DENDRITICE ASUPRA PARCURSULUI RĂSPUNSURILOR ADVERSE (ADVERSE OUTCOME PATHWAY - AOP) PENTRU SENSIBILIZAREA CUTANATĂ

INTRODUCERE GENERALĂ

Metodă de testare bazată pe evenimentul important privind activarea celulelor dendritice

1. O substanță sensibilizantă pentru piele înseamnă o substanță care conduce la o reacție alergică în urma contactului cu pielea, astfel cum este definit în Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU) (1) și în Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor (CLP) ([1]). Există un acord general cu privire la principalele evenimentele biologice care stau la baza sensibilizării cutanate. Cunoștințele existente cu privire la mecanismele biologice și chimice asociate cu sensibilizarea cutanată au fost sintetizate sub forma unui parcurs al răspunsurilor adverse (AOP) în cadrul programului OCDE AOP (2), începând cu evenimentul declanșator molecular, prin evenimentele intermediare, până la efectele adverse, și anume dermatita alergică de contact. În acest caz, evenimentul declanșator molecular (mai exact, primul eveniment important) este reprezentat de legarea covalentă a substanțelor electrofile de centrele nucleofile din proteinele din piele. Al doilea eveniment important în acest AOP se desfășoară în cheratinocite și include răspunsuri inflamatorii, precum și modificări ale expresiei genice asociate cu parcursurile de semnalizare de celule specifice, precum parcursurile care depind de elemente de răspuns antioxidant/electrofil (ERA). Al treilea eveniment important este activarea celulelor dendritice (CD), de regulă evaluate prin exprimarea markerilor celulari de suprafață specifici, chemochine și citocine. Al patrulea eveniment important este activarea și proliferarea celulară T, care este evaluată în mod indirect în testul local asupra ganglionilor limfatici murini (LLNA) (3).

2. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE (TG) privind testarea nr. 442E (2017). Aceasta descrie teste *in vitro* care abordează mecanismele descrise în cadrul evenimentului important privind activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată (2). MT cuprinde teste care urmează să fie utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante în conformitate cu GHS al ONU și Regulamentul CLP.

   Testele descrise în prezenta MT sunt:

   — Testul de activare a liniilor celulare umane (h-CLAT)

   — Testul U937 de activare a liniilor celulare (U-SENS ™)

   — Testul Interleuk-8 Reporter Gene Assay (testul IL-8 Luc)

3. Testele incluse în această metodă de testare și în Orientarea TG corespunzătoare a OCDE pot fi diferite în ceea ce privește procedura utilizată pentru a genera datele și valorile măsurate, dar pot fi utilizate în mod nediscriminatoriu pentru a aborda cerințele țărilor pentru rezultatele testelor privind evenimentul cheie cu privire la activarea celulelor dendritice ale AOP pentru sensibilizarea cutanată, beneficiind în același timp de acceptarea reciprocă a datelor a OCDE.

([1]) Regulamentul (CE) nr. 1272/2008 al Parlamentului European și al Consiliului din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006, JO L 353/1, 31.12.2008

▼M8

Context și principii ale testelor incluse în metoda de testare bazată pe evenimentul important

4. Evaluarea sensibilizării cutanate a implicat, de regulă, utilizarea de animale de laborator. Metodele clasice care utilizează cobai, testul de maximizare pe cobai (GPMT) al lui Magnusson și Kligman și testul Buehler (MT B.6) (4) evaluează atât fazele de inducție, cât și cele de reacție de hipersensibilitate a sensibilizării cutanate. Testele pe murini, LLNA (MT B.42) (3) și cele două variante ale sale care nu sunt radioactive, LLNA: DA (MT B.50) (5) și LLNA: BrdU-ELISA (MT B.51) (6), toate evaluează exclusiv răspunsul de inducție și, de asemenea, au fost acceptate, întrucât acestea oferă un avantaj față de testele pe cobai din punctul de vedere al bunăstării animalelor, alături de o măsurare obiectivă a fazei de inducție a sensibilizării cutanate.

5. Au fost adoptate metode de testare *in chemico* și *in vitro* recente, care sunt bazate pe mecanică și care abordează primul eveniment important [(MT B.59; Testul reactivității directe a peptidelor (7)] și al doilea eveniment important [(MT B.60; metoda de testare ARE-Nrf2 ale luciferazei (8)] al sensibilizării cutanate AOP, pentru a contribui la evaluarea potențialului de pericol de sensibilizare cutanată pe care îl prezintă substanțele chimice.

6. Încercările descrise în prezenta metodă de testare măsoară fie modificarea în exprimarea markerului (markerilor) celular(i) de suprafață asociat (asociați) procesului de activare a monocitelor și a CD în urma expunerii la substanțe sensibilizante (de exemplu: CD54, CD86), fie modificările în exprimarea IL-8, o citocină asociată cu activarea CD. Au fost raportate substanțe sensibilizante pentru piele pentru a induce exprimarea markerilor cu membrană celulară, precum CD40, CD54, CD80, CD83 și CD86, în plus față de inducerea citocinelor proinflamatorii, precum IL-1β și TNF-α, precum și a mai multor chemochine, inclusiv IL-8 (CXCL8) și CCL3 (9) (10) (11) (12), asociate cu activarea CD (2).

7. Însă, întrucât activarea CD reprezintă doar un singur eveniment important al AOP privind sensibilizarea cutanată (2) (13), este posibil ca informațiile obținute în urma testelor care măsoară doar markerii activării CD să nu fie suficiente pentru a concluziona cu privire la prezența sau absența potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Prin urmare, datele obținute în urma testelor descrise în cadrul acestei metode de testare sunt propuse pentru susținerea diferențierii dintre substanțele sensibilizante pentru piele (mai exact, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și substanțele nesensibilizante atunci când sunt utilizate în cadrul strategiilor integrate pentru testare și evaluare (IATA), împreună cu alte informații suplimentare relevante, de exemplu, cele rezultate din teste *in vitro* care abordează alte evenimente importante ale AOP privind sensibilizarea cutanată, precum și metode care nu implică testarea, inclusiv extrapolări ale datelor referitoare la substanțe chimice analoage (13). Exemple de utilizare de date generate în urma acestor teste în cadrul abordărilor definite, mai exact, al abordărilor standardizate atât în legătură cu setul de surse informaționale utilizate, cât și în cadrul procedurii aplicate datelor pentru obținerea de previziuni, au fost publicate (13) și pot fi folosite ca elemente utile în cadrul IATA.

8. Testele descrise în prezenta metodă de testare nu pot fi folosite pe cont propriu, nici pentru a subclasifica substanțele sensibilizante pentru piele în subcategoriile 1A și 1B, astfel cum sunt definite în GHS al ONU/Regulamentul CLP, pentru autoritățile care pun în aplicare aceste două subcategorii opționale, și nici pentru a prevedea potența pentru deciziile în materie de evaluare a siguranței. Cu toate acestea, în funcție de cadrul de reglementare, rezultatele pozitive obținute cu aceste metode pot fi utilizate în mod independent pentru a clasifica o substanță chimică în categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP.

▼M8

9. Termenul „substanță chimică de testat” este utilizat în această metodă de testare pentru a se referi la ceea ce este supus testării ([1]) și nu are legătură cu aplicabilitatea testelor la testarea substanțelor monocomponente și a substanțelor și/sau amestecurilor multicomponente. În prezent sunt disponibile informații limitate privind aplicabilitatea testelor la substanțe/amestecuri multicomponente (14) (15). Cu toate acestea, testele sunt aplicabile din punct de vedere tehnic pentru testarea substanțelor și amestecurilor multicomponente. Cu toate acestea, înainte de utilizarea acestei metode de testare pe un amestec pentru a genera date pentru un obiectiv de reglementare specific, se ia în considerare dacă și, în caz afirmativ, din ce cauză aceasta poate oferi rezultate adecvate în scopul respectiv ([2]). Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului. În plus, atunci când se testează substanțe sau amestecuri multicomponente, se ia în considerare posibila interferență a componentelor citotoxice cu răspunsurile observate.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Capitolul B.42 din prezenta anexă: Studiu pe ganglionul limfatic local.

(4) Capitolul B.6 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată.

(5) Capitolul B.50 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: DA.

(6) Capitolul B.51 din prezenta anexă: Sensibilizare cutanată: Studiu pe ganglionul limfatic local: BrdU-ELISA.

(7) Capitolul B.59 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată in chemico: Testul reactivității directe a peptidelor (Direct Peptide Reactivity Assay – DPRA).

(8) Capitolul B.60 din prezenta anexă: Sensibilizarea cutanată *in vitro*: Metoda de testare a ERA-Nrf2 ale luciferazei.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL și Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H și Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) În iunie 2013, reuniunea comună a OCDE a convenit că, acolo unde este posibil, ar trebui aplicată o utilizare mai consecventă a termenului „substanță chimică de testat” care descrie ceea ce este testat în orientările OCDE noi și actualizate privind testele.

([2]) Această teză a fost propusă și convenită în cadrul reuniunii WNT din aprilie 2014

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y și Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OCDE (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, anexele 1 și 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Apendicele 1

Sensibilizarea Cutanată in vitro: Testul de Activare a Liniilor Celulare Umane (h-clat)

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul h-CLAT cuantifică modificările produse la nivelul exprimării markerilor celulari de suprafață asociați cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86 și CD54), la nivelul liniei celulare monocitice umane THP-1 afectate de leucemie în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1)(2). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante.

2. Testul h-CLAT a fost evaluat într-un laborator de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (EURL ECVAM) - un studiu de validare coordonat și o evaluare inter pares independentă ulterioară desfășurată de către Comitetul științific consultativ al EURL ECVAM (ESAC). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul h-CLAT a fost recomandat de EURL ECVAM (3) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor h-CLAT în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințele bibliografice (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. Testul h-CLAT s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 80 % în cadrul aceluiași laborator și între laboratoare (3) (12). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (13), precum și în alte studii publicate (14), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a substanțelor sensibilizante pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de cele nesensibilizante este de 85 % (N = 142) cu o sensibilitate de 93 % (94/101) și o specificitate de 66 % (27/41) (pe baza unei analize repetate efectuate de EURL ECVAM (12), având în vedere toate datele existente și neluând în calcul rezultatele negative pentru substanțele chimice cu o valoare a Log Kow mai mare de 3,5, astfel cum este descris la alineatul (4). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin testul h-CLAT să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (4) (13) (15). Coroborate, aceste informații indică utilitatea metodei h-CLAT în ceea ce privește contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru testul h-CLAT ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, metoda h-CLAT s-a dovedit a fi aplicabilă substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (3) (14) (15). Metoda h-CLAT se aplică substanțelor chimice de testat solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (14)]. Substanțele chimice de testat cu un Log Kow mai mare de 3,5 tind să producă rezultate negative false (14). Prin urmare, nu ar trebui să fie luate în considerare rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5. Cu toate acestea, rezultatele pozitive obținute în cazul substanțelor chimice de testat având o valoare Log Kow mai mare de 3,5

▼M8

ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca substanță sensibilizantă pentru piele. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare utilizate (16), cât și din cauza condițiilor experimentale, prohaptenele (și anume, substanțele care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P 450) și prehaptenele (și anume, substanțe activate prin autooxidare), în special cele cu o rată de oxidare lentă, pot furniza, de asemenea, rezultate negative la testul h-CLAT (15). Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul h-CLAT (17); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC sau PI. Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC [a se vedea alineatul (24)] sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 1-2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele negative ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a metodei h-CLAT la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, metoda h-CLAT susține diferențierea între substanțele sensibilizante pentru piele și cele nesensibilizante. Însă aceasta poate să contribuie, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare (4)(5)(9) atunci când este utilizată în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele h-CLAT să fundamenteze evaluarea potenței.

6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Metoda h-CLAT reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață (și anume, CD86 și CD54) pe o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie, celule THP-1, în urma expunerii timp de 24 de ore la substanța chimică de testat. Aceste molecule de suprafață constituie markeri tipici de activare THP-1 monocitică și pot imita activarea DC, care joacă un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului de suprafață se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi marcați cu fluorocrom. De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului de suprafață în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Intensitatea relativă a fluorescenței markerilor de suprafață, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv [a se vedea alineatul (26)], pentru a susține diferențierea între substanțe sensibilizante și nesensibilizante

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

8. Înainte de a introduce testul descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71 pentru utilizare de rutină, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice utilizând cele zece substanțe de verificare menționate în apendicele 1.2. În plus, utilizatorii testului ar trebui să întrețină o bază de date istorică incluzând date generate în urma verificărilor de reactivitate [a se vedea alineatul (11)] și a martorilor pozitivi și a celor tratați cu solvenți/vehicule [a se vedea alineatele (20)-(22)] și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul lor este menținută în timp.

▼M8

PROCEDURA

9. Acest test este bazat pe protocolul nr. 158 (18) h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM), care reprezintă protocolul utilizat pentru studiul de validare coordonat de EURL ECVAM. Se recomandă utilizarea acestui protocol atunci când se pune în aplicare și se utilizează metoda h-CLAT în laborator. Componentele și procedurile principale pentru metoda h-CLAT sunt descrise în continuare, în două etape: *testul de determinare a dozei* și *măsurarea expresiei CD86/CD54*.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară monocitică umană afectată de leucemie, și anume THP-1, ar trebui să fie utilizată pentru desfășurarea metodei h-CLAT. Se recomandă ca celulele (TIB-202™) să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.

11. Celulele THP-1 sunt cultivate la 37°C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate, în mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal bovin (FBS), 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 100 de unități/ml de penicilină și 100 µg/ml de streptomicină. Poate fi evitată utilizarea penicilinei și a streptomicinei în mediul de cultură. Însă, într-un astfel de caz, utilizatorii ar trebui să verifice dacă absența antibioticelor din mediul de cultură nu are niciun impact asupra rezultatelor, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare enumerate în apendicele 1.2. În orice caz, pentru a reduce la minimum riscul de contaminare, bunele practici de cultură celulară ar trebui să fie urmate independent de prezența sau absența antibioticelor în mediul de cultură celulară. Celulele THP-1 sunt însămânțate în mod obișnuit la 2-3 zile la densitatea de 0,1-0,2 × 10^6 celule/ml. Acestea ar trebui să fie menținute la densități cuprinse între 0,1 și 1,0 × 10^6 celule/ml. Înainte de a le utiliza pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unui control de reactivitate. Controlul de reactivitate ar trebui să fie efectuat asupra celulelor folosindu-se martori pozitivi, 2,4-dinitroclorbenzen (DNCB) (CAS nr. 97-00-7, puritate ≥ 99 %) și sulfat de nichel ($NiSO_4$) (CAS nr. 10101-97-0, puritate ≥ 99 %) și martorul negativ, acidul lactic (AL) (CAS nr. 50-21-5, puritate ≥ 85 %), la două săptămâni după decongelare. Atât DNCB, cât și $NiSO_4$ ar trebui să genereze un răspuns pozitiv al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54, iar AL ar trebui să genereze un răspuns negativ al markerilor celulari de suprafață CD86 și CD54. Sunt utilizate pentru analiză numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Celulele pot fi reproduse până la două luni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 30. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 20-24.

12. În scopul testării, celulele THP-1 sunt însămânțate la o densitate de 0,1 × 10^6 celule/ml sau de 0,2 × 10^6 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 72 de ore sau, respectiv, 48 de ore. Este important ca densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după perioada de cultivare prealabilă, să fie cât mai consecventă posibil în fiecare experiment (aplicându-se una dintre cele două condiții de cultivare prealabilă descrise mai sus), deoarece densitatea celulară din balonul de cultură, imediat după cultivarea prealabilă, ar putea afecta expresia CD86/CD54 indusă de alergeni (19). În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 2 × 10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o tavă cu fund plat cu 24 de godeuri (500 µl, 1 × 10^6 celule/godeu) sau pe o tavă cu fund plat cu 96 de godeuri (80 µl, 1,6 × 10^5 celule/godeu).

Testul de determinare a dozei

13. Se efectuează *un test de determinare a dozei* pentru determinarea CV75, care este concentrația substanței chimice de testat, în urma căruia să se ajungă la o viabilitate celulară (VC) de 75 % în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul. Valoarea CV75 este utilizată pentru a determina concentrația substanțelor chimice de testat pentru măsurarea expresiei *CD86/CD54* [a se vedea alineatele (20)-(24)].

▼M8

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru metoda h-CLAT, substanțele chimice de testat sunt dizolvate sau dispersate în mod stabil [a se vedea, de asemenea, alineatul (4)] în soluție salină sau în mediu ca prime opțiuni de solvent/vehicul sau în dimetil sulfoxid (DMSO, puritate ≥99 %) ca a doua opțiune de solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă sau nu formează dispersii stabile în cei doi solvenți/vehicule anterioare, în concentrații finale de 100 mg/ml (în soluție salină sau în mediu) sau de 500 mg/ml (în DMSO). Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.

15. Pornind de la soluțiile mamă ale substanțelor de testat de 100 mg/ml (în soluție salină sau medie) sau de 500 mg/ml (în DMSO), ar trebui să fie parcurse următoarele etape de diluare:

— Pentru soluția salină sau mediu ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). În cazul în care concentrația finală în partea superioară, în tava de 1 000 μg/ml, nu este toxică, concentrația maximă ar trebui să fie determinată din nou prin efectuarea unui nou test de citotoxicitate. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească 5 000 μg/ml în cazul substanțelor chimice de testat dizolvate sau dispersate în mod stabil în soluție salină sau în mediu salin.

— În cazul DMSO ca solvent/vehicul: Se prepară opt soluții mamă (opt concentrații) cu ajutorul unor diluții în serie duble utilizând solventul/vehiculul aferent. Aceste soluții mamă sunt apoi diluate în continuare de 250 de ori în mediu de cultură (soluții de lucru). Concentrația finală în plăci nu ar trebui să depășească 1 000 μg/ml, chiar dacă această concentrație nu este toxică.

Soluțiile de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunere prin adăugarea unui volum egal de soluție de lucru la volumul suspensiei celulare THP-1 din placă (a se vedea, de asemenea, punctul 17) pentru a obține încă o diluare dublă (de regulă, plaja finală de concentrații de pe placă este de 7,81-1 000 μg/ml).

16. Martorul tratat cu solvent/vehicul utilizat în metoda h-CLAT este mediu de cultură [pentru substanțele chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil (a se vedea punctul 4 fie în mediu, fie în soluție salină) sau DMSO (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO) testat la o singură concentrație finală în placă de 0,2 %. Acesta este supus aceluiași proces de diluție descris pentru soluțiile de lucru de la punctul 15.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Mediul de cultură sau soluțiile de lucru descrise la punctele 15 și 16 sunt amestecate 1: 1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 24 sau 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de 24 ± 0,5 ore la 37°C în soluție cu 5 % CO_2. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubația cu substanțele chimice de testat (20).

▼M8

Colorarea cu iodură de propidiu (IP)

18. După 24 ± 0,5 ore de expunere, celulele sunt transferate în eprubete de eșantioane și colectate prin centrifugare. Se îndepărtează supernatantele și se suspendă din nou celulele rămase în 200 µl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în 600 µl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție salină tamponată cu fosfat conținând 0,1 % albumină din ser bovin (soluție tampon de colorare). Se transferă 200 µl de suspensie celulară pe o placă cu fund rotund de 96 de godeuri (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau în micro-eprubetă (în cazul unei plăci cu 24 de godeuri) și se spală de două ori într-o cantitate de 200 µl (în cazul plăcii cu 96 de godeuri) sau de 600 µl (în cazul plăcii cu 24 de godeuri) de soluție tampon de colorare. În cele din urmă, celulele sunt suspendate din nou în soluție tampon de colorare (de exemplu, 400 µl) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 µl) (spre exemplu, concentrația finală a IP este de 0,625 µg/ml). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7-aminoactinomicina D (7-AAD), albastru de tripan sau alții, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alterative generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 1.2.

Măsurarea citotoxicității prin citometria de flux și estimarea valorii CV75

19. Absorbția IP este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-3. Sunt acumulate în total 10 000 de celule vii (IP negativă). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, trebuie să se acumuleze până la 30 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Valoarea CV75 (a se vedea punctul 13), adică o concentrație care indică o rată de 75 % a THP-1 de supraviețuire a celulelor (25 % citotoxicitate), este calculată prin interpolare log-lineară folosind următoarea ecuație:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

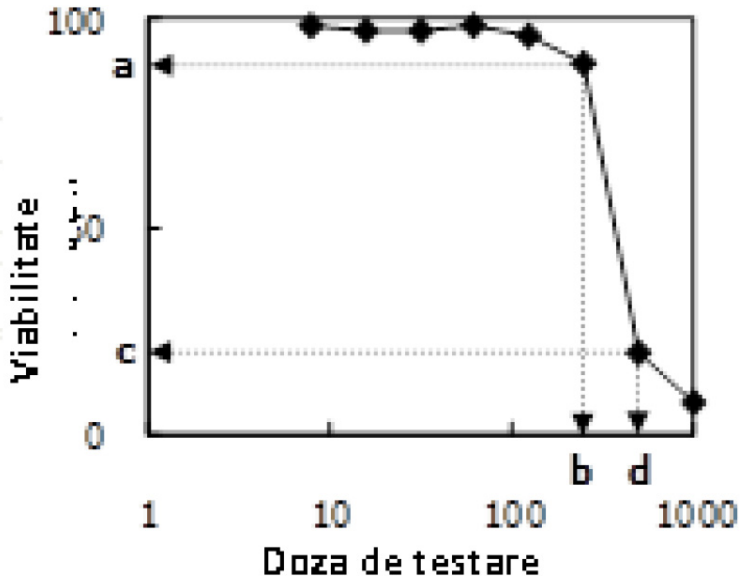
Unde:

a reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 75 %

c reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 75 %

b și d sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare a și, respectiv, c

▼**M8**



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV75, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

Măsurarea expresiei CD86/CD54

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

20. Solventul/vehiculul corespunzător (soluție salină, medie sau DMSO; a se vedea punctul 14) este utilizat pentru a dizolva sau a dispersa în mod stabil substanțele chimice de testat. Substanțele chimice de testat sunt diluate mai întâi la concentrația corespunzătoare valorii de 100 de ori (pentru soluția salină sau mediu) sau de 500 de ori (pentru DMSO) din 1,2 × CV75, determinate în *testul de determinare a dozei* (a se vedea punctul 19). În cazul în care valoarea CV75 nu poate fi determinată (și anume, dacă nu se observă un grad suficient de citotoxicitate în *testul de determinare a dozei*), ar trebui utilizată ca și concentrație inițială cea mai mare concentrație solubilă sau dispersată în mod stabil a substanței chimice de testat preparată împreună cu fiecare solvent/vehicul. Concentrația finală în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Apoi sunt efectuate diluții în serie de 1,2 ori folosind solventul/vehiculul aferent pentru a obține soluțiile mamă [opt concentrații cuprinse între 100×1,2 × CV75 și 100×0,335 × CV75 (în cazul soluției saline sau al mediului) sau între 500×1,2 × CV75 și 500×0,335 × CV75 (în cazul DMSO)] pentru a fi testate prin metoda h-CLAT (a se vedea protocolul DB-ALM nr. 158 pentru un exemplu al schemei de dozare). Soluțiile mamă sunt apoi diluate în continuare de 50 de ori (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 250 de ori (în cazul DMSO) în mediul de cultură (soluțiile de lucru). Aceste soluții de lucru sunt utilizate, în cele din urmă, pentru expunerea la un alt factor final de diluare dublă în placă. În cazul în care rezultatele nu îndeplinesc criteriile de acceptare descrise la punctele 29 și 30 cu privire la viabilitatea celulară, *testul de determinare a dozei* poate fi repetat pentru a determina o valoare CV75 mai exactă. Este de precizat faptul că pot fi utilizate doar plăci cu 24 de godeuri pentru măsurarea expresiei CD86/CD54.

21. Martorul tratat cu solvent/vehicul este preparat astfel cum este descris la punctul 16. Martorul pozitiv utilizat în metoda h-CLAT este DNCB (a se vedea punctul 11), pentru care soluțiile mamă sunt preparate în DMSO și diluate astfel cum este descris în cazul soluțiilor mamă de la punctul 20. DNCB ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* la o concentrație unică finală în placă (de regulă, 4,0 µg/ml). Pentru a obține o concentrație de 4,0 µg/ml a DNCB în placă, se prepară o soluție mamă de 2 mg/ml de DNCB, care este apoi diluată în continuare de 250 de ori în mediu de cultură până la o soluție de lucru de 8 µg/ml. În mod

▼M8

alternativ, valoarea CV75 a DNCB, care este determinată în fiecare instalație de testare, ar putea fi utilizată, de asemenea, ca o concentrație a martorului pozitiv. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. În cazul martorilor pozitivi, concentrația finală unică în placă nu ar trebui să depășească valoarea de 5 000 µg/ml (în cazul soluției saline sau al mediului) sau de 1 000 µg/ml (în cazul DMSO). Criteriile de acceptare a testelor sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică testată (a se vedea punctul 29), cu excepția ultimului criteriu de acceptare, deoarece martorul pozitiv este testat într-o singură concentrație.

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

22. Pentru fiecare substanță chimică de testat și substanță martor este necesar un singur experiment pentru a obține o predicție. Fiecare experiment constă în cel puțin două testări independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54* (a se vedea punctele 26-28). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi sau în aceeași zi, cu condiția ca pentru fiecare test: a) să se prepare soluții mamă și soluții de lucru ale substanțelor chimice de testat și ale soluțiilor de anticorpi independente și proaspete și b) să se utilizeze celule recoltate în mod independent (de exemplu, se colectează celule din flacoane de cultură diferite); însă celulele pot proveni din aceeași trecere. Substanțele chimice de testat și substanțele martor preparate ca soluții de lucru (500 µl) sunt amestecate cu 500 µl de celule suspendate (1×10^6 celule) la un raport de 1:1, iar celulele sunt incubate timp de 24 ± 0,5 ore, conform descrierii de la punctele 20 și 21. În cadrul fiecărui test, o singură replică pentru fiecare concentrație a substanței chimice de testat și a substanței martor este suficientă, deoarece se obține o predicție din cel puțin două teste independente.

Colorarea și analiza celulelor

23. După 24 ± 0,5 ore de expunere, celulele sunt transferate din placa de 24 de godeuri în eprubete pentru probe, colectate prin centrifugare și apoi spălate de două ori cu 1 ml de soluție tampon de colorare (dacă este necesar, se pot lua măsuri suplimentare de spălare). După spălare, celulele sunt blocate cu 600 µl de soluție de blocare [soluție tampon de colorare care conține globulină 0,01 % (g/v) (fracția Cohn fracțiune II, III, umană; SIGMA, #G2388-10G sau echivalentul)] și incubate la 4°C timp de 15 minute. După blocare, celulele sunt împărțite în trei părți alicote de 180 µl pe o placă de 96 de godeuri cu fund rotund sau în micro-eprubetă.

24. După centrifugare, celulele sunt colorate cu 50 µl de soluție de anticorpi anti-CD86, anti-CD54 sau de șoarece IgG1 (izotip) etichetată FITC la 4°C timp de 30 de minute. Anticorpii descriși în protocolul DB-ALM nr. 158 al testului h-CLAT (18) ar trebui să fie utilizați prin diluarea în proporție de 3:25 v/v [pentru CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] sau de 3:50 v/v [pentru CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6,5B5) și IgG1 (DAKO, #X0927)] cu soluție tampon de colorare. Acești factori de diluție a anticorpilor au fost definiți de către dezvoltatorii de teste ca fiind cei care asigură cel mai bun raport semnal/zgomot. Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cele mai bune concentrații de utilizare. Se pot utiliza și alți anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom și/sau anti-CD54 în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 1.2. Trebuie remarcat faptul că modificarea clonei sau a furnizorului anticorpilor descriși în protocolul h-CLAT DB-ALM nr. 158 (18) poate afecta rezultatele. După ce sunt spălate de două sau de mai multe ori în 150 µl de soluție-tampon de colorare, celulele sunt resuspendate în soluție-tampon de colorare (de exemplu, 400 µl) și se adaugă soluție IP (de exemplu, 20 µl pentru a obține o concentrație finală de 0,625 µg/ml) sau

▼M8

o altă soluție a markerului de citotoxicitate (a se vedea punctul 18). Nivelurile de expresie ale CD86 și CD54 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

25. Expresia CD86 și CD54 este analizată utilizând citometria de flux la canalul de acumulare FL-1. Pe baza intensității medii geometrice a fluorescenței (MFI), intensitatea relativă a fluorescenței (RFI) a CD86 și CD54 pentru celule și celule tratate chimic cu martor (ctrl) pozitiv se calculează conform ecuației următoare:

$$RFI = \frac{MFI\ of\ chemical\text{–}treated\ cell - MFI\ of\ chemical\text{–}treated\ isotype\ control\ cells}{MFI\ of\ solvent/vehicle\text{–}treated\ ctrl\ cells - MFI\ of\ solvent/vehicle\text{–}treated\ isotype\ ctrl\ cells} \times 100$$

Viabilitatea celulară de la celulele cu martor izotip (ctrl) (care sunt colorate cu anticorpi IgG1 (izotip) de șoarece) este calculată, de asemenea, conform ecuației descrise la punctul 19.

Model predictiv

26. Pentru măsurarea expresiei *CD86/CD54*, fiecare substanță chimică de testat este testată prin cel puțin două teste independente pentru a se obține o singură estimare (POZITIV sau NEGATIV). O estimare h-CLAT este considerată POZITIVĂ dacă este îndeplinită cel puțin una dintre următoarele condiții în cadrul derulării a 2 sau a cel puțin 2 din 3 teste independente; în caz contrar, estimarea h-CLAT este considerată NEGATIVĂ (figura 1):

— Valoarea RFI a CD86 este mai mare sau egală cu 150 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %);

— Valoarea RFI a CD54 este mai mare sau egală cu 200 % la orice concentrație testată (cu viabilitate celulară ≥ 50 %).

27. Pe baza celor de mai sus, dacă primele două teste generează rezultate pozitive pentru CD86 și/sau rezultate pozitive pentru CD54, estimarea h-CLAT este considerată a fi POZITIVĂ și nu este necesară derularea unui al treilea test. În mod similar, în cazul în care primele două teste sunt negative pentru ambii markeri, estimarea h-CLAT este considerată a fi NEGATIVĂ (ținând seama în mod corespunzător de dispozițiile de la punctul 30), fără a fi necesară derularea unui al treilea test. Însă, dacă rezultatele primelor două teste nu sunt concordante pentru cel puțin unul dintre markeri (CD54 sau CD86), este necesară derularea unui al treilea test, iar estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei teste individuale (și anume, două din trei). În acest sens, ar trebui remarcat faptul că, dacă sunt derulate două teste independente, iar unul este pozitiv doar pentru CD86 (denumit în continuare „P_1”) și celălalt este pozitiv doar pentru CD54 (denumit în continuare „P_2”), este necesară derularea unui al treilea test. În cazul în care acest al treilea test este negativ pentru ambii markeri (denumiți în continuare „N”), estimarea h-CLAT este considerată ca fiind NEGATIVĂ. Pe de altă parte, în cazul în care al treilea test este pozitiv pentru oricare dintre markeri (P_1 sau P_2) sau pentru ambii markeri (denumit în continuare „P_{12}”), estimarea h-CLAT este considerată POZITIVĂ.

▼**M8**

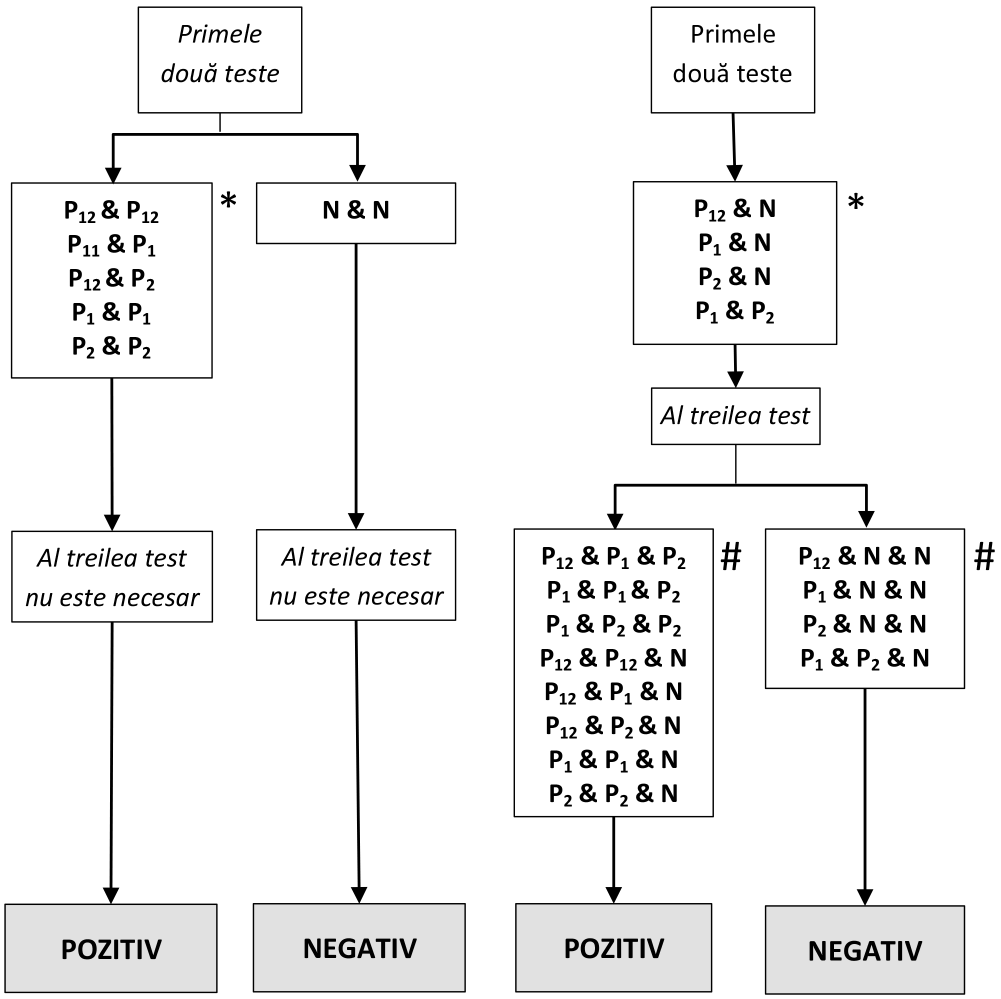


Figura 1: Model predictiv utilizat în metoda h-CLAT. O estimare h-CLAT ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA şi în conformitate cu dispozițiile de la punctele 7 și 8 din Introducerea generală.

P_1: test cu estimare pozitivă doar pentru CD86; P_2; test cu estimare pozitivă doar pentru CD54; P_{12}: test cu estimare pozitivă pentru CD86 şi CD54; N: test cu estimare pozitivă pentru CD86 sau CD54.

*Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste, independent de ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

#Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus, însă nu reflectă ordinea în care acestea ar putea fi obținute.

28. Pentru substanțele chimice de testat estimate ca fiind POZITIVE cu testul h-CLAT, ar putea fi determinate opțional două valori ale concentrațiilor efectivă (CE), CE150 pentru CD86 și CE200 pentru CD54, şi anume concentrația la care substanțele chimice de testat au indus o valoare RFI de 150 sau 200. Aceste valori CE ar putea contribui la evaluarea potenței de sensibilizare (9) atunci când sunt utilizate în abordări integrate precum IATA (4) (5) (6) (7) (8). Acestea sunt calculate pe baza ecuațiilor următoare:

▼**M8**

$$EC150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200\ (for\ CD54) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

unde

A_{conc} este concentrația cea mai scăzută în μg/ml cu RFI > 150 (CD86) sau 200 (CD54)

B_{conc} este concentrația cea mai ridicată în μg/ml cu RFI < 150 (CD86) sau 200 (CD54)

A_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai scăzută cu RFI > 150 (CD86) sau 200 (CD54)

B_{RFI} este valoarea RFI la concentrația cea mai ridicată cu RFI < 150 (CD86) sau 200 (CD54)

Cu scopul de a deriva cu o precizie mai mare valorile CE150 și CE200, se pot solicita trei teste independente pentru *măsurarea expresiei CD86/CD54*. Valorile finale ale CE150 și CE200 sunt determinate apoi ca valoarea mediană a valorilor CE calculate în cadrul celor trei teste independente. Atunci când numai două din trei teste independente îndeplinesc criteriile de pozitivitate (a se vedea punctele 26-27), se adoptă valoarea cea mai mare CE150 sau CE200 dintre cele două valori calculate.

Criterii de acceptare

29. Atunci când este utilizată metoda h-CLAT (22) (27), trebuie să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.

— Viabilitatea celulară a mediului și a martorilor tratați cu solvenți/vehicule ar trebui să fie mai mare de 90 %.

— La martorul tratat cu solvent/vehicul, valorile RFI ale CD86 și CD54 nu ar trebui să fie peste criteriile pozitive (RFI ≥150 % pentru CD86 și RFI ≥ 200 % pentru CD54). Valorile RFI ale martorului tratat cu solvent/vehicul se calculează cu ajutorul formulei descrise la punctul 25 [„valoarea IMF a substanței chimice” ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a solventului/vehiculului”, iar „valoarea IMF a solventului/vehiculului” ar trebui să fie înlocuită cu „valoarea IMF a martorului (mediului)”].

— În cazul martorilor pentru mediu și a celor tratați cu solvent/vehicul, raportul IMF al CD86 și CD54 pe martor izotop ar trebui să fie > 105 %.

— În cazul martorului pozitiv (DNCB), valorile RFI pentru CD86 și CD54 ar trebui să respecte criteriile pozitive (RFI ≥ 150 pentru CD86 și RFI ≥ 200 pentru CD54) și viabilitatea celulară ar trebui să fie mai mare de 50 %.

— Pentru substanța chimică de testat, viabilitatea celulară ar trebui să fie peste 50 % în cel puțin patru concentrații verificate în cadrul fiecărui test.

30. Rezultatele negative sunt acceptabile numai pentru substanțele chimice de testat care prezintă o viabilitate celulară mai mică de 90 % la cea mai mare concentrație testată (și anume, 1,2 x CV75 conform schemei de diluție în serie descrise la punctul 20). În cazul în care viabilitatea celulară la 1,2 × CV75 este mai mare sau egală cu 90 %, rezultatul negativ ar trebui să fie eliminat. Într-un astfel de caz, se recomandă să se încerce reluarea procesului de selecție a dozei prin repetarea testului pentru determinarea CV75. Ar trebui remarcat faptul că, atunci când se utilizează 5 000 μg/ml în soluție salină (sau mediu ori alți solvenți/vehicule), 1 000 μg/ml în DMSO sau concentrația solubilă maximă ca și concentrație de testare maximă a unei substanțe chimice de testat, un rezultat negativ este acceptabil chiar dacă viabilitatea celulară este mai mare de 90 %.

▼**M8**

Raportul testului

31. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testat

Substanța monocomponentă

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, Log Kow, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Martori

Martor pozitiv

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, Log K_{ow}, solubilitatea în apă, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

▼M8

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori tratați cu solvent/vehicul decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— Descrierea testului utilizat:

— Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la au fost obținute acestea);

— Citometria de flux utilizată (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentelor, globulina, anticorpii și markerul de citotoxicitate utilizat;

— Procedura utilizată pentru a demonstra capabilitatea laboratorului de a efectua testul prin testarea unor substanțe de verificare și procedura utilizată pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp, de exemplu, datele anterioare privind martorii și/sau datele anterioare privind verificările asupra reactivității.

Criterii de acceptare a testului

— Viabilitatea celulară, valorile IMF și RFI obținute cu martorul solventului/vehiculului în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară și valorile RFI obținute cu martorul pozitiv în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară a tuturor concentrațiilor testate ale substanței chimice de testat.

▼**M8**

Procedura de testare

— Numărul de teste utilizate;

— Concentrațiile substanței chimice de testat, timpul de aplicare și de expunere utilizat (dacă acestea diferă de cele recomandate)

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV75 (dacă este cazul), a valorilor IMF geometrice individuale, a valorilor RFI, a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150/CE200 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodei h-CLAT;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Material accesibil la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Material accesibil la adresa: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Material accesibil la adresa: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris, Franța, 2005, 96 pp.

(22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) Organizația Națiunilor Unite ONU (2013). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A cincea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Apendicele 1.1

DEFINIțII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (21).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (22).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV75: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 75 %.

EC150: concentrațiile care indică valorile RFI de 150 în expresia CD86

EC200: concentrațiile care indică valorile RFI de 200 în expresia CD54

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Martor pentru mediu: O probă replică netratată care conține toate componentele unui sistem de testare. Această probă este analizată împreună cu probele tratate cu substanța chimică de testat și cu alte probe martor pentru a determina dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul de testare.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

▼M8

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată

Intensitatea relativă a fluorescenței (RFI): Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței (MFI) la celulele tratate chimic comparativ cu MFI din celulele tratate cu solvent/vehicul.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (21).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (21).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 0,1 % albumină din ser bovin.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (21).

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestei metode.

▼**M8**

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care se referă la elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (23).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (21).

▼M8

Apendicele 1.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării h-CLAT pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV75, EC150 și EC200 care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu metoda h-CLAT. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru metoda h-CLAT (3) (14).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice prin metoda h-CLAT

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare *in vivo* (1)	CV75 Interval de referință în µg/ml (2)	Rezultate h-CLAT pentru CD86 (Interval de referință pentru EC150 în µg/ml) (2)	Rezultate h-CLAT pentru CD54 (Interval de referință pentru EC200 în µg/ml) (2)
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Sensibilizant (extrem)	2-12	Pozitiv (0,5-10)	Pozitiv (0,5-15)
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	5-95	Pozitiv (<40)	Negativ (>1,5) (3)
Sulfat de nichel	10101-97-0	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-500	Pozitiv (<100)	Pozitiv (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Sensibilizant (moderat)	30-400	Negativ (>10) (3)	Pozitiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Lichid	Sensibilizant (slab)	>20	Negativ (>5) (3)	Pozitiv (<250)
Imidazolidinil uree	39236-46-9	Solid	Sensibilizant (slab)	25-100	Pozitiv (20-90)	Pozitiv (20-75)
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Non-sensibilizant	>5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non-sensibilizant	>5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non-sensibilizant	1500-5 000	Negativ (>5 000)	Negativ (>5 000)
Acid 4-aminobenzoic	150-13-0	Solid	Non-sensibilizant	>1 000	Negativ (>1 000)	Negativ (>1 000)

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

(1) Previzionarea pericolelor (și a potenței) *in vivo* se bazează pe date LLNA (3) (14). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (24).

(2) Pe baza valorilor istorice observate (13) (25).

(3) Din punct de vedere istoric, au fost obținute preponderent rezultate negative pentru acest marker și, prin urmare, este de așteptat, cel mai probabil, un rezultat negativ. Intervalul furnizat a fost stabilit pe baza celor câteva rezultate pozitive istorice observate. În cazul în care se obține un rezultat pozitiv, valoarea CE ar trebui să se încadreze în intervalul de referință raportat.

▼**M8**

Apendicele 2

SENSIBILIZAREA CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL U937 DE ACTIVARE A LINIEI CELULARE (U-SENS™)

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Testul U-SENS™ cuantifică modificarea produsă la nivelul exprimării unui marker celular de suprafață asociat cu procesul de activare a monocitelor și celulelor dendritice (CD) (și anume, CD86), la nivelul liniei celulare umane U937 afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Nivelurile de exprimare măsurate ale markerului celular de suprafață CD86 de la nivelul liniei celulare U937 sunt apoi utilizate pentru susținerea diferențierii între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.

2. Testul U-SENS™ a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) coordonat de L'Oreal și ulterior supus unei evaluări independente inter pares efectuate de Comitetul Consultativ Științific (ESAC) al laboratorului de referință al Uniunii Europene pentru metode alternative la testarea pe animale (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing - EURL ECVAM) (3). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, U-SENS™ a fost recomandat de EURL ECVAM (4) pentru a fi utilizat în cadrul unei IATA în vederea sprijinirii diferențierii între substanțele sensibilizante și cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. În documentul său de orientare privind raportarea abordărilor structurate ale integrării datelor și ale surselor de informații individuale utilizate în cadrul IATA pentru sensibilizarea pielii, OCDE abordează în prezent o serie de studii de caz care descriu diferite strategii de testare și modele de predicție. Una dintre diferitele abordări definite este bazată pe testul U-SENS (5). În literatura de specialitate (4) (5) (7) sunt prezentate, de asemenea, exemple de utilizare a datelor U-SENS™, în combinație cu alte informații, inclusiv date istorice și actuale valabile despre oameni (6).

3. Testul U-SENS™ s-a dovedit a fi transferabil către laboratoare cu experiență în tehnici de cultură celulară și analiza citometriei de flux. Nivelul de reproductibilitate în estimări, care poate fi preconizat în urma testării, este de ordinul a 90 % și 84 % în același laborator și între laboratoare (8). Rezultatele generate și incluse în studiul de validare (8), precum și în alte studii publicate (1), indică, în general, faptul că, în comparație cu rezultatele LLNA, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de 86 % (N = 166) cu o sensibilitate de 91 % (118/129) și o specificitate de 65 % (24/37). În comparație cu rezultatele umane, precizia de deosebire a sensibilizantelor pentru piele (și anume, categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) de substanțele nesensibilizante este de 77 % (N = 101) cu o sensibilitate de 100 % (58/58) și o specificitate de 47 % (20/43). Există o probabilitate mai mare ca estimările negative false realizate prin U-SENS™, comparativ cu LLNA, să vizeze substanțe chimice care prezintă un nivel scăzut până la moderat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1B din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nu substanțe chimice care prezintă un nivel ridicat de potență de sensibilizare cutanată (și anume, subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (1) (8) (9). Coroborate, aceste informații indică utilitatea testului U-SENS™ în ceea ce privește contribuirea la identificarea pericolelor de sensibilizare cutanată. Cu toate acestea, valorile de precizie furnizate în prezentul document pentru U-SENS™ ca test independent sunt doar orientative, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea metodelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

▼**M8**

4. Pe baza datelor disponibile în prezent, testul U-SENS ™ s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat (inclusiv ingrediente cosmetice, de exemplu, conservanți, surfactanți, agenți activi, coloranți) care acoperă o varietate de grupe funcționale organice, de proprietăți fizico-chimice, de grade de potență de sensibilizare cutanată (determinate în studii *in vivo*), precum și spectrul de mecanisme de reacție cunoscute a fi asociate cu sensibilizarea cutanată (și anume, acceptorul Michael, formarea bazei Schiff, agentul de transfer pe bază acrilică, reacția de substituție nucleofilă bimoleculară [SN2] sau reacția de substituție nucleofilă aromatică [SNAr]) (1) (8) (9) (10). Testul U-SENS™ se aplică substanțelor chimice de testat care sunt solubile sau care formează dispersii stabile (și anume, un coloid sau o suspensie în care substanța chimică de testat nu se sedimentează sau se separă de solvent/vehicul în diferite faze) într-un solvent/vehicul adecvat [a se vedea alineatul (13)]. Substanțele chimice din setul de date, careu au fost raportate ca fiind prehaptene (și anume, substanțe activate prin oxidare) sau prohaptene (și anume, substanțe care necesită activare enzimatică, de exemplu prin intermediul enzimelor P450), au fost corect estimate prin testul U-SENS™ (1) (10). Substanțele care perturbă membrana pot conduce la rezultate fals pozitive datorită unei creșteri nespecifice a expresiei CD86, întrucât 3 din 7 rezultate fals pozitive aferente clasificării de referință *in vivo* au fost surfactanți (1). Ca atare, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți ar trebui să fie luate în considerare cu prudență, iar rezultatele negative cu surfactanți ar putea fi totuși utilizate pentru a sprijini identificarea substanței chimice de testat ca nefiind nesensibilizantă. Substanțele chimice de testat fluorescente pot fi analizate prin testul U-SENS™ (1); cu toate acestea, substanțele chimice de testat fluorescente puternice care emit la aceeași lungime de undă ca și izotiocianatul de fluoresceină (FITC) sau iodura de propidiu (PI) vor interfera cu detecția prin citometria de flux și, astfel, nu pot fi evaluate în mod corect folosind anticorpi conjugați cu FITC (rezultate potențial fals pozitive) sau PI (viabilitatea nu este măsurabilă). Într-un astfel de caz, se pot folosi alți anticorpi marcați cu fluorocrom sau alți markeri de citotoxicitate, cu condiția să se poată demonstra că acestea oferă rezultate similare celor generate de anticorpii marcați cu FITC sau PI [a se vedea alineatul (18)], de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Având în vedere cele de mai sus, rezultatele pozitive obținute cu surfactanți și rezultatele negative obținute cu substanțele chimice de testat fluorescente puternic ar trebui interpretate în contextul limitărilor menționate și împreună cu alte surse de informații în cadrul IATA. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului U-SENS™ la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, acestea nu ar trebui utilizate pentru respectivele categorii specifice.

5. Conform descrierii de mai sus, testul U-SENS™ susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Însă acesta poate contribui, de asemenea, la evaluarea potenței de sensibilizare atunci când este utilizat în abordări integrate precum IATA. Cu toate acestea, se impun studii suplimentare, de preferință pe baza datelor cu privire la oameni, pentru a determina în ce mod ar putea rezultatele U-SENS™ să fundamenteze evaluarea potenței.

6. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 2.1.

Principiul Testului

7. Testul U-SENS™ reprezintă un test *in vitro* care cuantifică modificările expresiei markerului celular de suprafață la nivelul unei linii celulare umane, celule U937, afectate de limfomul histiocitar în urma expunerii timp de 45±3 ore la substanța chimică de testat. Markerul de suprafață CD86 este un marker tipic de activare U937. CD86 este cunoscut ca fiind o moleculă co-stimulatorie care poate să imite activarea monocitică, jucând un rol esențial în pregătirea de celule de tip T. Modificările expresiei markerului celular de suprafață CD86 se măsoară prin citometria de flux în urma colorării celulelor cu anticorpi etichetați cu izotiocianat de fluoresceină (FITC). De asemenea, măsurarea citotoxicității este efectuată (de exemplu, utilizând PI) în același timp cu scopul de a se evalua dacă se produce o reglare în sus a expresiei markerului celular de suprafață CD86 în cazul concentrațiilor subcitotoxice. Indicele de simulare (IS) al markerului

▼M8

celular de suprafață CD86, în comparație cu martorul tratat cu solvent/vehicul, se calculează și se utilizează în modelul predictiv (a se vedea punctul 19), pentru a susține diferențierea între sensibilizante și nesensibilizante.

Demonstrarea Performanței

8. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 2.2, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (11). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 11) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 15-16) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

Procedura

9. Acest test se bazează pe protocolul nr. 183 al U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) (12). Procedurile standard de operare (PSO) ar trebui să fie utilizate la punerea în aplicare și utilizarea testului U-SENS™ în laborator. Se poate utiliza un sistem automat de derulare a testului U-SENS ™ dacă se poate demonstra că acesta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. Componentele și procedurile principale pentru testul U-SENS™ sunt descrise în continuare.

Pregătirea celulelor

10. Linia celulară umană afectată de limfomul histiocitic, și anume U937 (13), ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului U-SENS™. Celulele (clona CRL1593.2) ar trebui să fie obținute de la o bancă de celule calificată, cum ar fi American Type Culture Collection.

11. Celulele U937 sunt cultivate la 37 °C în atmosferă de 5 % CO_2 și de umiditate, în mediu RPMI-1 640 completat cu 10 % ser fetal de vițel (SFV), 2 mM L-glutamină, 100 de unități/ml de penicilină și 100 µg/ml de streptomicină (mediu complet). Celulele U937 sunt trecute, de regulă, la 2-3 zile la densitatea de 1,5 sau 3×10^5 celule/ml. Densitatea celulară nu ar trebui să depășească 2×10^6 celule/ml, iar viabilitatea celulară măsurată prin excluderea albastrului de tripan ar trebui să fie ≥ 90 % (nu se aplică la prima trecere după decongelare). Înainte de a le utiliza pentru testare, fiecare lot de celule, SFV sau anticorpi ar trebui să fie calificat prin efectuarea unui control de reactivitate. Verificarea de reactivitate a celulelor ar trebui să fie efectuat folosind martorul pozitiv, acidul picril-sulfonic (acid 2,4,6-trinitrobenzensulfonic: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, puritate de ≥ 99 %) și acidul lactic ca martor negativ (AL) (CASRN 50-21-5, puritate de ≥ 85 %), după cel puțin o săptămână de la decongelare. Pentru verificarea de reactivitate, ar trebui să fie testate șase concentrații finale pentru fiecare dintre cei doi martori (TNBS: 1, 12.5, 25, 50, 75, 100µg/ml și AL: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție a CD86 pozitivă și legată de concentrație (de exemplu, în cazul în care o concentrație pozitivă, CD86 S.I. ≥ 150, este urmată de o concentrare cu o valoare a CD86 S.I crescută) și AL solubilizat în mediu complet ar trebui să producă o reacție negativă a CD86 (a se vedea punctul 21). Ar trebui utilizat pentru analiză numai lotul de celule pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes de două ori. Celulele pot fi reproduse până la șapte săptămâni după decongelare. Numărul de trecere nu ar trebui să depășească 21. Verificarea de reactivitate ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 18-22.

▼M8

12. În scopul testării, celulele U937 sunt însămânțate la o densitate de 3 x 10^5 celule/ml sau de 6 x 10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură pentru două sau, respectiv, o zi. Ar putea fi utilizate alte condiții de cultivare prealabilă decât cele descrise mai sus dacă este asigurată o argumentare științifică suficientă și dacă se poate demonstra că aceasta generează rezultate similare, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. În ziua testării, celulele recoltate din balonul de cultură sunt suspendate din nou în mediu de cultură proaspăt, la 5 × 10^5 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri de 100 µl cu fund plat (densitate celulară finală de 0,5 × 10^5 celule/godeu).

Pregătirea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

13. Evaluarea solubilității este efectuată înainte de testare. În acest scop, substanțele chimice de testat se dizolvă sau se dispersează în mod stabil la o concentrație de 50 mg/ml în mediu complet ca primă opțiune de solvent sau în dimetilsulfoxid (DMSO, puritate de ≥ 99 %) ca al doilea solvent/vehicul dacă substanța chimică de testat nu este solubilă în solventul/vehiculul ca mediu complet. Pentru testare, substanța chimică de testat este dizolvată într-o concentrație finală de 0,4 mg/ml în mediu complet dacă substanța chimică este solubilă în acest solvent/vehicul. Dacă substanța chimică este solubilă numai în DMSO, aceasta se dizolvă la o concentrație de 50 mg/ml. Se pot utiliza și alți solvenți/vehicule decât cele descrise mai sus în cazul în care se prezintă o justificare științifică suficientă. Ar trebui să se țină seama de stabilitatea substanței chimice de testat în solventul/vehiculul final.

14. Substanțele chimice de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Deoarece nu este efectuat un test de determinare a dozelor, prima dată ar trebui să fie testate șase concentrații finale (1, 10, 20, 50, 100 și 200 µg/ml) în solventul/vehiculul corespunzător, fie în mediu complet, fie în mediu de 0,4 % DMSO. Pentru testele ulterioare, începând cu o cantitate de 0,4 mg/ml într-un mediu complet sau 50 mg/ml în DMSO, se prepară soluții de substanțe chimice de testat, cel puțin patru soluții de lucru (și anume, cel puțin patru concentrații) folosind solvent/vehicul corespunzător. Soluțiile de lucru sunt, în final, utilizate pentru tratare prin adăugarea unui volum egal de suspensie celulară U937 (a se vedea punctul 11 de mai sus) la volumul de soluție de lucru din placă pentru a obține o diluție suplimentară dublă (12). Concentrațiile (cel puțin patru concentrații) pentru orice test ulterior sunt alese pe baza rezultatelor individuale ale tuturor testelor anterioare (8). Concentrațiile finale utilizabile sunt de 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 și 200 µg/ml. Concentrația finală maximă este de 200 µg/ml. În cazul]n care se observă o valoare pozitivă a CD86 la 1 µg/ml, se evaluează o cantitate de 0,1 µg/ml pentru a se afla concentrația substanței chimice de testat care nu induce CD86 deasupra pragului pozitiv. Pentru fiecare test, EC150 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul pozitiv al CD86 de 150 %, a se vedea punctul 19) se calculează dacă se observă o reacție sub forma unei concentrații pozitive de tip CD86. În cazul în care substanța chimică de testat induce o reacție pozitivă a CD86 nelegată de concentrație, calcularea EC150 ar putea să nu fie relevantă, astfel cum este descris în protocolul DB-ALM nr. 183 privind U-SENS ™ (12). Pentru fiecare test, CV70 (concentrația la care o substanță chimică atinge pragul de citotoxicitate de 70 %, a se vedea punctul 19) se calculează ori de câte ori este posibil (12). Pentru a analiza efectul reacției concentrației în urma creșterii CD86, orice concentrații dintre concentrațiile utilizabile ar trebui alese ca fiind repartizate în mod egal între valoarea EC150 (sau cea mai mare concentrație necitotoxică negativă CD86) și CV70 (sau cea mai mare concentrație admisă, și anume, 200 µg/ml). Ar trebui să fie testate minimum patru concentrații pe test și să existe cel puțin două concentrații comune cu testul (testele) anterior (anterioare) pentru comparație.

▼M8

15. Martorul tratat cu solvent/vehicul și utilizat în testul U-SENS ™ este un mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în mediu complet) (a se vedea punctul 4) sau o soluție de 0,4 % DMSO în mediu complet (pentru substanțe chimice de testat solubilizate sau dispersate în mod stabil în DMSO).

16. Martorul pozitiv utilizat în testul U-SENS ™ este TNBS (a se vedea punctul 11), preparat în mediu complet. TNBS ar trebui utilizat ca martor pozitiv pentru măsurarea expresiei CD86 la o concentrație unică finală în placă (50 μg/ml) determinând o viabilitate celulară de > 70 %. Pentru a obține o concentrație de 50 μg/ml de TNBS în placă, se prepară o soluție mamă de 1 M (și anume, 293 mg/ml) de TNBS în mediu complet, care este apoi diluată de 2 930 de ori în mediu complet până la o soluție de lucru de 100 μg/ml. Acidul lactic (AL, CAS 50-21-5) ar trebui utilizat ca martor negativ în cantitate de 200 μg/ml solubilizat în mediu complet (dintr-o soluție mamă de 0,4 mg/ml). În fiecare placă din cadrul fiecărui test sunt preparate trei replici de martor netratat în mediu complet, martor tratat cu solvent/vehicul, precum și martori negativi și pozitivi (12). Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor. Criteriile de acceptare a testului sunt aceleași cu cele descrise pentru substanța chimică de testat (a se vedea punctul 12).

Aplicarea substanțelor chimice de testat și a substanțelor martor

17. Martorul tratat cu solvent/vehicul sau soluțiile de lucru descrise la punctele 14-16 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe placa cu fund plat de 96 de godeuri (a se vedea punctul 12). Plăcile tratate sunt apoi incubate timp de 45 ± 3 ore la 37 °C în soluție cu 5 % CO_2. Înainte de incubație, plăcile sunt închise etanș cu membrană semipermeabilă pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între celulele tratate cu substanțe chimice de testat (12).

Colorarea celulelor

18. După 45±3 ore de expunere, celulele sunt transferate într-o placă de microtitrare în formă de V și colectate prin centrifugare. Interferența în solubilitate este definită ca fiind cristale sau picături observate la microscop la 45±3 ore după tratament (înainte de colorarea celulelor). Se îndepărtează supernatantele, iar restul celulelor sunt spălate o singură dată cu o soluție salină cu tampon de fosfat (PBS) de 100 μl rece ca gheața conținând 5 % ser fetal de vițel (soluție tampon de colorare). După centrifugare, celulele sunt resuspendate în 100 μl de soluție tampon de colorare și colorate cu 5 μl (de exemplu, 0,25 μg) de anticorpi anti-CD86 etichetați FITC sau IgG1 (izotip) de șoarece la 4 °C timp de 30 de minute, departe de lumină. Ar trebui să se utilizeze anticorpii descriși în Protocolul DB-ALM nr. 183 al U-SENS ™ (pentru CD86: clona BD-PharMingen #5556 57: Fun-1 sau clona Caltag/Invitrogen # MHCD8601: BU63; și pentru IgG1: BD-PharMingen #5557 48 sau Caltag/Invitrogen # GM4992). Pe baza experienței dezvoltatorilor de teste, intensitatea fluorescenței anticorpilor este, de obicei, consecventă între diferite loturi. Pentru test ar putea fi utilizate alte clone sau alt furnizor de anticorpi pentru care a fost efectuată cu succes verificarea de reactivitate (a se vedea punctul 11). Cu toate acestea, utilizatorii ar putea avea în vedere titrarea anticorpilor în condițiile din laboratorul propriu pentru a defini cea mai bună concentrație de utilizare. Se poate utiliza și un alt sistem de detecție, de exemplu, anticorpi anti-CD86 marcați cu fluorocrom în cazul în care se poate demonstra că aceștia generează rezultate similare cu cele ale anticorpilor conjugați FITC, de exemplu prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2. După spălare de două ori în 100 μl de soluție tampon de colorare și o dată în 100 μl PBS rece ca gheața, celulele sunt resuspendate în PBS rece ca gheața (de exemplu, 125 μl pentru probe analizate manual eprubetă cu eprubetă sau 50 μl utilizând o placă cu auto-eșantionare) și se adaugă soluție IP (concentrație finală de 3 μg/ml). Se pot utiliza alți markeri de citotoxicitate, cum ar fi 7-aminoactinomicina D (7-AAD) sau albastru de tripan, în cazul în care se poate demonstra că acțiunile de colorare alternative generează rezultate

▼M8

similare cu IP, de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare din apendicele 2.2.

Analiza prin citometria de flux

19. Nivelurile de expresie ale CD86 și viabilitatea celulară sunt analizate folosind citometria de flux. Celulele sunt afișate în interiorul unui segment cu puncte având o dimensiune (FSC) și o granularitate (SSC) stabilite la scara logaritmică pentru a identifica în mod clar populația dintr-un prim grup R1 și a elimina resturile. Pentru fiecare godeu se impune un număr total vizat de 10 000 de celule în grupul (gate) R1. Celulele din același grup R1 sunt afișate pe un segment cu puncte FL3 sau FL4/SSC. Celulele viabile sunt delimitate prin plasarea unui al doilea grup R2 care selectează populația de celule negative de iodură de propidiu (canalul FL3 sau FL4). Viabilitatea celulară poate fi calculată folosind următoarea ecuație prin programul de analiză citometrică. Atunci când viabilitatea celulară este scăzută, ar putea fi acumulate până la 20 000 de celule, inclusiv celule moarte. În mod alternativ, pot fi acumulate date timp de un minut după inițierea analizei.

$$Cell\ viability = \frac{Number\ of\ living\ cells}{Total\ Number\ of\ aquired\ cells} \times 100$$

Apoi se măsoară procentul de celule pozitive FL1 se măsoară între aceste celule viabile grupate sub R2 (în cadrul R1). Exprimarea CD86 la suprafața celulei este analizată pe un segment cu puncte FL1/SSC care formează un grup de celule viabile (R2).

Pentru godeurile cu mediu complet/IgG1, markerul de analiză este stabilit în apropierea populației principale, astfel încât martorii tratați cu mediu complet să aibă IgG1 în intervalul-țintă 0,6-0,9 %.

Interferența culorii este definită ca o schimbare a segmentului cu puncte etichetat cu FITC IgG1 (media geometrică IgG1 FL1 S.I. ≥ 150 %).

Indicele de stimulare (S.I.) al CD86 pentru celulele martorilor (netratate sau în soluție de 0,4 % DMSO) și celulele tratate chimic se calculează conform ecuației următoare:.

$$S.I. = \frac{\%\ of\ CD86^{+} treated\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} treated\ cells}{\%\ of\ CD86^{+} control\ cells - \%\ of\ IgG1^{+} control\ cells} \times 100$$

% din celulele netratate ale martorilor $IgG1^{+}$: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1 definite cu markerul de analiză (interval acceptat de ≥ 0,6 % și < 1,5 %, a se vedea punctul 22) în celulele viabile netratate.

% din celulele tratate/ale martorilor $IgG1^{+}/CD86^{+}$: denumit drept procent din celulele IgG1 pozitive FL1/CD86 măsurate fără deplasarea markerului de analiză între celulele viabile ale martorilor/tratate.

▼**M8**

Date Şi Raportare

Evaluarea datelor

20. În testul U-SENS ™ se calculează următorii parametri: valoarea CV70, adică o concentrație care indică 70 % din supraviețuirea celulelor U937 (30 % citotoxicitate) și valoarea EC150, și anume, concentrația la care substanțele chimice de testat au indus un indice de stimulare (S.I.) de 150 % pentru CD86.

CV70 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

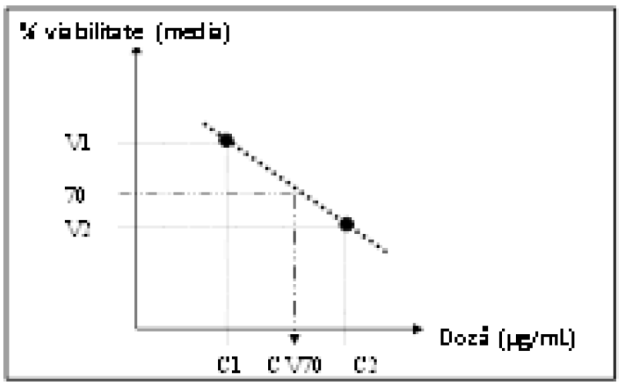
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

Unde:

V1 reprezintă valoarea minimă a viabilității celulare peste 70 %

V2 reprezintă valoarea maximă a viabilității celulare sub 70 %

C1 și C2 sunt concentrații care arată valoarea viabilității celulare V1 și, respectiv, V2



Se pot utiliza alte abordări pentru derivarea valorii CV70, cu condiția să se demonstreze că acest lucru nu are niciun impact asupra rezultatelor (de exemplu, prin testarea substanțelor de verificare).

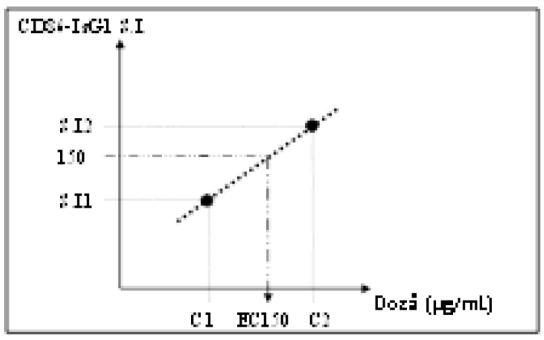
EC150 se calculează prin interpolare logliniară folosind următoarea ecuație:

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

Unde:

C2 este cea mai mare concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 < 150 % (S.I. 1)

C2 este cea mai redusă concentrație în µg/ml cu S.I. al CD86 ≥ 150 % (S.I. 2).



▼M8

Se calculează valorile EC150 și CV70

— pentru fiecare test: valorile EC150 și CV70 individuale sunt utilizate ca instrumente de investigare a efectului reacției concentrației generate de creșterea CD86 (a se vedea punctul 14),

— valoarea totală a CV70 este determinată pe baza valorilor viabilității medii (12),

— valoarea totală a EC150 este determinată pe baza valorii medii a S.I. al valorilor CD86 pentru substanța chimică de testat prevăzută ca fiind POZITIVĂ în urma testului U-SENS ™ (a se vedea punctul 21) (12).

Model predictiv

21. Pentru măsurarea expresiei CD86, fiecare substanță chimică de testat este testată în cel puțin patru concentrații și prin cel puțin două teste independente (efectuate în zile diferite) pentru a se obține o singură estimare (NEGATIV sau POZITIV).

— Concluzia individuală a unui test U-SENS ™ este considerată negativă (denumită în continuare „N”) dacă S.I. al CD86 este mai mic de 150 % la toate concentrațiile care nu sunt citotoxice (viabilitate celulară ≥ 70 %) și dacă nu se observă interferențe (citotoxicitate, solubilitate: a se vedea punctul 18 sau culoarea: a se vedea punctul 19 indiferent de concentrațiile care nu sunt citotoxice la care este detectată interferența). În toate celelalte cazuri: atunci când S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % și/sau se observă interferențe, concluzia individuală a unui test U-SENS ™ este considerată pozitivă (denumită în continuare „P”).

— O estimare în urma unui test U-SENS™ este considerată NEGATIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt negative (N) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele negative (N), estimarea U-SENS™ este considerată NEGATIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.

— O estimare în urma unui test U-SENS™ este considerată POZITIVĂ dacă cel puțin două teste independente sunt pozitive (P) (figura 1). Dacă primele două teste sunt ambele pozitive (P), estimarea U-SENS™ este considerată POZITIVĂ și nu trebuie să fie efectuat un al treilea test.

— Deoarece nu este efectuată o analiză pentru determinarea dozelor, există o excepție în cazul în care, în cadrul primului test, S.I. al CD86 este mai mare sau egal cu 150 % doar la cea mai mare concentrație care nu este citotoxică. Atunci testul este considerat a fi NECONCLUDENT (NC) și ar trebui să se testeze concentrații suplimentare (între cea mai mare concentrație fără citotoxicitate și cea mai scăzută concentrația cu citotoxicitate - a se vedea punctul 20) în cadrul unor teste suplimentare. În cazul în care un test este identificat ca fiind NC, ar trebui să fie efectuate cel puțin încă două teste, precum și un al patrulea test în cazul în care al doilea și al treilea test nu sunt concordante (N și/sau P independent) (figura 1). Testele efectuate în continuare vor fi considerate pozitive chiar dacă numai în cazul unei concentrații care nu este citotoxică este generată o valoare a CD86 egală cu sau peste 150 %, deoarece valoarea concentrației a fost ajustată pentru substanța chimică de testat specifică. Estimarea finală va fi bazată pe rezultatul majoritar al celor trei sau patru teste individuale (și anume: două din trei sau două din patru) (figura 1).

▼**M8**

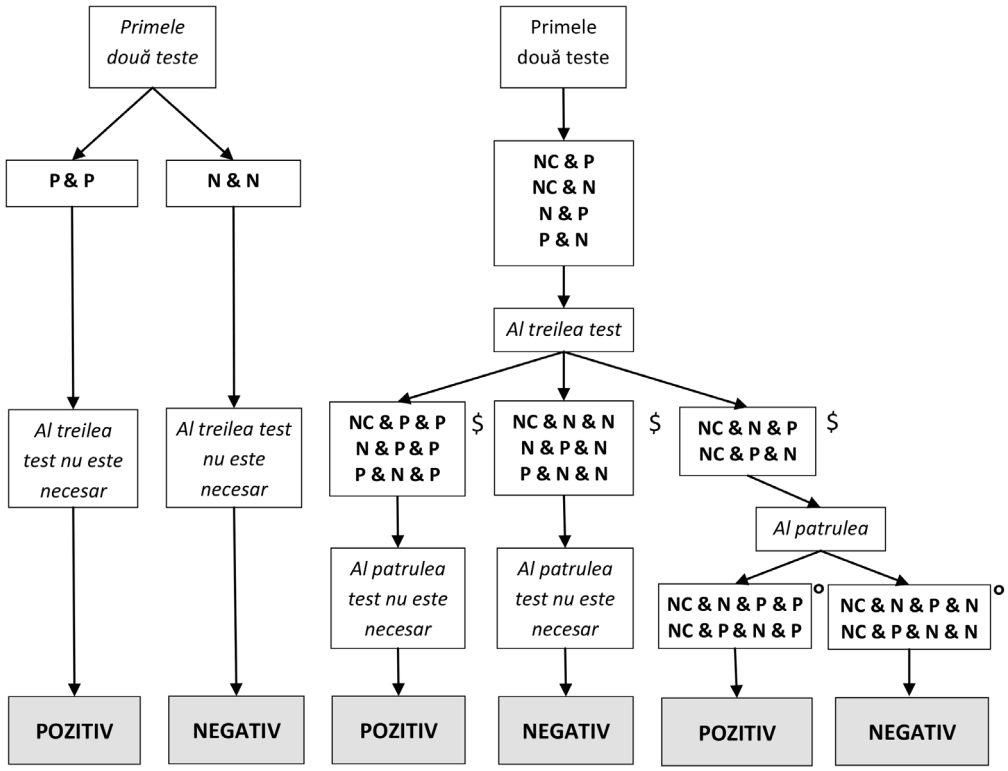


Figura 1: Model predictiv utilizat în testul U-SENS™. O estimare U-SENS™ ar trebui să fie analizată în cadrul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de la punctul 4 și de la punctele 7, 8 și 9 din Introducerea generală.

N: Test fără o valoare pozitivă a CD86 sau observarea unei interferențe;

P: Test cu o valoare pozitivă a CD86 și/sau cu observarea unei (unor) interferențe;

NC: Neconcludent. Primul test fără concluzii atunci când valoarea CD86 este pozitivă numai la cea mai mare concentrație necitotoxică;

#: O concluzie individuală de tipul Neconcludent (NC), care este atribuită numai primului test efectuat determină în mod automat necesitatea efectuării unui al treilea test pentru a ajunge la o majoritate a concluziilor de tip Pozitiv (P) sau Negativ (N) în cadrul a cel puțin două din trei teste independente.

$: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele trei teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor două teste prezentate în caseta de mai sus.

°: Casetele prezintă combinațiile relevante ale rezultatelor obținute în cadrul cele patru teste, pe baza rezultatelor obținute în cadrul primelor trei teste prezentate în caseta de mai sus.

Criterii de acceptare

22. Atunci când este utilizat testul U-SENS™ (12), ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare.

— La sfârșitul perioadei de expunere de 45±3 ore, viabilitatea medie a celulelor U937 netratate triple trebuia să fie > 90 % și nu se observă nicio deviere a expresiei CD86. Expresia de bază a valorii CD86 a celulelor U937 netratate a trebuit să fie cuprinsă între ≥ 2 % și ≤ 25 %.

▼M8

— În cazul în care DMSO este utilizat ca solvent, valabilitatea martorului tratat cu vehicul DMSO este evaluată prin calcularea unui S.I. al DMSO în raport cu celulele netratate, iar viabilitatea medie a celulelor triple a trebuit să fie > 90 %. Martorul tratat cu vehicul DMSO este valabil dacă valoarea medie a S.I. triplu al CD86 a fost sub 250 % din valoarea medie a S.I. al valorii CD86 a celulelor U937 netratate.

— Testele sunt considerate valabile dacă cel puțin două din trei valori IgG1 ale celulelor U937 netratate s-au încadrat între ≥ 0,6 % și < 1,5 %.

— Martorul negativ testat în paralel (acidul lactic) este considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost negative (CD86 S.I. < 150 %) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară ≥ 70 %).

— Martorul pozitiv (TNBS) a fost considerat valabil dacă cel puțin două din cele trei replici au fost pozitive (CD86 S.I. < 150 %) și fără citotoxicitate (viabilitate celulară ≥ 70 %).

Raportul testului

23. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanță chimică de testat

Substanța monocomponentă

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitate în mediu complet, solubilitate în DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— aspectul fizic, solubilitate în mediu complet, solubilitate în DMSO și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

▼**M8**

Martori

Martor pozitiv

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitatea DMSO, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, în măsura în care este posibil și dacă este cazul;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare a testelor, dacă este cazul.

Martor negativ și tratat cu solvent/vehicul

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori tratați cu solvent/vehicul decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea testului utilizat;

— Linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la au fost obținute acestea);

— citometria de flux utilizată (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele instrumentelor, anticorpii și markerul de citotoxicitate utilizat;

— Procedura utilizată pentru a demonstra capabilitatea laboratorului de a efectua testul prin testarea unor substanțe de verificare și procedura utilizată pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp, de exemplu, datele anterioare privind martorii și/sau datele anterioare privind verificările asupra reactivității.

Criterii de acceptare a testului

— viabilitatea celulară valorile S.I. ale CD86 obținute cu martorul tratat cu solvent/vehicul în comparație cu intervalele de acceptare;

▼M8

— viabilitatea celulară și valorile S.I. obținute cu martorul pozitiv în comparație cu intervalele de acceptare;

— Viabilitatea celulară a tuturor concentrațiilor testate ale substanței chimice de testat.

Procedura de testare

— Numărul de teste utilizate;

— Concentrațiile substanței chimice de testat, timpul de aplicare și de expunere utilizat (dacă acestea diferă de cele recomandate)

— Durata expunerii;

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— Prezentarea tabelară a datelor, inclusiv a valorilor CV70 (dacă este cazul), a valorilor de viabilitate celulară, a valorilor CE150 (dacă este cazul) obținute pentru substanța chimică de testat și pentru martorul pozitiv în cadrul fiecărui test, precum și o indicație privind clasificarea substanței chimice de testat în funcție de modelul predictiv;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute în urma testului U-SENS™;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Material accesibil la adresa: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Publicație disponibilă la adresa: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Publicație disponibilă la adresa: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OCDE. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Material accesibil la adresa: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Organizația Națiunilor Unite ONU (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, a șasea ediție revizuită, New York & Geneva: United Nations Publications. Publicație disponibilă la adresa: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OCDE (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelles. Publicație disponibilă la adresa: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

Apendicele 2.1

DEFINIțII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (14).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (15).

Reacția concentrației CD86: Există o dependență de concentrație (sau o reacție a concentrației) atunci când o concentrație pozitivă (CD86 S.I. ≥ 150) este urmată de o concentrație cu o valoare S.I. a CD86 în creștere.

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV70: Concentrația estimată care indică o viabilitate celulară de 70 %.

Deviere: O deviere este definită prin următoarele situații i) valoarea % corectată a $CD86^+$ a celei de a treia replici a martorului netratat este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a $CD86^+$ a primei și celei de a doua replici ale martorului netratat; și ii) valoarea % corectată a $CD86^+$ a celei de a treia replici a martorului negativ este mai mică decât 50 % din media valorii % corectate a CD86+ a primei și celei de a doua replici ale martorului negativ.

EC150: concentrațiile estimate care arată S.I. de 150 % al expresiei CD86.

Citometria de flux: o tehnică citometrică prin care celulele au fost suspendate într-un flux fluid una câte una, printr-o focalizare a luminii care excită și care este difuzată în modele caracteristice asupra celulelor și a componentelor acestora; celulele sunt etichetate frecvent cu markeri fluorescenți, astfel încât lumina să fie absorbită mai întâi și apoi emisă la frecvențe modificate.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care mai mult de un singur component principal este prezent într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < de 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

▼**M8**

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice, de exemplu, prin oxidare.

Prohaptene: substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (14).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (14).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

S.I.: Indice de stimulare. Valorile relative ale intensității medii a fluorescenței la celulele tratate chimic comparativ cu celulele tratate cu solvent/vehicul.

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (14).

Soluție tampon de colorare: O soluție salină tamponată cu fosfat conținând o cantitate de 5 % ser fetal de vițel.

Substanță: un element chimic și compușii săi în stare naturală sau obținuți prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a-i păstra stabilitatea și orice impuritate care derivă din procesul utilizat, însă excluzând orice solvent care poate fi separat fără a afecta stabilitatea substanței sau fără a-i schimba compoziția.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestui test.

▼**M8**

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) pe tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pentru sănătate și pentru mediu, și care vizează elemente de comunicare corespunzătoare, de exemplu pictograme, cuvinte de semnalizare, fraze de pericol, fraze de precauție și fișe cu date de securitate, pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora, în scopul protejării populației (inclusiv a angajatorilor, a lucrătorilor, a transportatorilor, a consumatorilor și a serviciilor de urgență) și a mediului (16).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Test valabil: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit (14).

▼**M8**

Apendicele 2.2

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea în mod corect a estimării U-SENS™ pentru cele 10 substanțe de verificare recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori pentru CV70 și EC150 care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin 8 dintre cele 10 substanțe de verificare. Substanțele de verificare au fost selectate pentru a reprezenta intervalul de reacții pentru pericolele sensibilizării cutanate. Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul U-SENS™. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul U-SENS™ (1) (8).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru a demonstra performanțele tehnice cu testul U-SENS™

Substanțe de verificare	NR CAS	Stare fizică	Estimare *in vivo* ([1])	U-SENS Solvent/ Vehicul	U-SENS CV70 Interval de referință în µg/ml ([2])	U-SENS Interval de referință pentru EC150 în µg/ml ([2])
4-fenilendiamină	106-50-3	Solid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet ([3])	< 30	Pozitiv (≤ 10)
Acid picril-sulfonic	2508-19-2	Lichid	Sensibilizant (puternic)	Mediu complet	>50	Pozitiv (≤ 50)
Maleat de dietil	141-05-9	Lichid	Sensibilizant (moderat)	DMSO	10-100	Pozitiv (≤ 20)
Rezorcinol	108-46-3	Solid	Sensibilizant (moderat)	Mediu complet	>100	Pozitiv (≤ 50)
Alcool cinamic	104-54-1	Solid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (10-100)
4-alilanisol	140-67-0	Lichid	Sensibilizant (slab)	DMSO	>100	Pozitiv (<200)
Zaharină	81-07-2	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)
Glicerină	56-81-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid lactic	50-21-5	Lichid	Non-sensibilizant	Mediu complet	>200	Negativ (> 200)
Acid salicilic	69-72-7	Solid	Non-sensibilizant	DMSO	>200	Negativ (> 200)

Abrevieri: NR CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service

([1]) Pericolul și estimarea (potența) *in vivo* se bazează pe date LLNA (1) (8). Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (17).

([2]) Pe baza valorilor istorice observate (1) (8).

([3]) Mediu complet: Mediu RPMI-1640 completat cu 10 % ser fetal de vițel, 2 mM L-glutamină, 100 unități/ml penicilină și 100 µg/ml de streptomicină (8).

▼**M8**

Apendicele 3

SENSIBILIZARE CUTANATĂ *IN VITRO*: TESTUL IL-8 LUC

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

1. Spre deosebire de testele care analizează expresia markerilor celulari de suprafață, testul IL8-Luc cuantifică modificările expresiei IL-8, o citocină asociată activării celulelor dendritice (CD). În linia celulară raportoare de tip IL-8 derivată din THP-1 (THP-G8, determinată pornind de la linia celulară monocitică acută la om afectată de leucemie THP-1), expresia IL-8 se măsoară în urma expunerii la substanțe sensibilizante (1). Expresia luciferazei este utilizată apoi pentru a contribui la diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele.

2. Testul IL-8 Luc a fost evaluat în cadrul unui studiu de validare (2) realizat de Centrul Japonez pentru Validarea Metodelor Alternative (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods - JaCVAM), **Ministerul economiei, comerțului și industriei** (METI) și Societatea Japoneză **pentru Metode Alternative la Testarea pe Animale (JSAAE**) și, ulterior, supus unei evaluări inter pares independente desfășurate sub auspiciile JaCVAM (3) și ale Ministerului Sănătății, Muncii și Bunăstării (MHLW) cu sprijinul **International Cooperation on Alternative Test** Methods (ICATM). Având în vedere toate dovezile disponibile și contribuțiile autorităților de reglementare și ale părților interesate, testul IL-8 Luc este considerat util în cadrul unei IATA pentru a diferenția substanțele sensibilizante de cele nesensibilizante în scopul clasificării și etichetării pericolelor. Exemple privind utilizarea datelor din cadrul testului IL-8 Luc în combinație cu alte informații sunt prezentate în referințe bibliografice (4) (5) (6).

3. Testul IL-8 Luc s-a dovedit a fi transmisibil la laboratoare cu experiență în cultura celulelor și măsurarea luciferazei. În cadrul aceluiași laborator și între laboratoare ratele de reproductibilitate au fost de 87,7 % și, respectiv, 87,5 % (2). Datele generate în cadrul studiului de validare (2) și alte lucrări publicate (1) (6) arată că, în comparație cu LLNA, prin testul IL-8 Luc un număr de 118 din 143 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 25 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc privind distincția între sensibilizantele pentru piele (categoria 1 din GHS al ONU/Regulamentul CLP) și nesensibilizantele pentru piele (neîncadrate într-o categorie din GHS al ONU/Regulamentului CLP) este de 86 % (101/118) cu o sensibilitate de 96 % (92/96) și o specificitate de 41 % (9/22). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate descris mai jos (punctul 5), un număr de 113 din 136 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 23 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia testului IL-8 Luc este de 89 % (101/113), sensibilitatea de 96 % (92/96) și specificitatea de 53 % (9/17). Folosind datele despre oameni citate în Urbisch et al. (7), prin testul IL-8 Luc un număr de 76 din 90 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative, iar 14 substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 80 % (61/76), sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 39 % (7/18). Cu excepția substanțelor din afara domeniului de aplicabilitate, un număr de 71 din 84 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind pozitive sau negative prin testul IL-8 Luc, iar 13 de substanțe chimice au fost estimate ca fiind neconcludente; precizia este de 86 % (61/71, sensibilitatea de 93 % (54/58) și specificitatea de 54 % (7/13). Există o probabilitate mai mare să apară estimări negative false în urma testului IL-8 Luc în cazul substanțelor chimice care prezintă un nivel scăzut/moderat de potență de sensibilizare cutanată (subcategoria 1A din GHS al ONU/Regulamentul CLP) (6). Împreună, informațiile sprijină rolul testului IL-8 Luc în ceea ce privește identificarea pericolelor de sensibilizare a pielii. Valoarea preciziei furnizate pentru testul IL-8 Luc ca și test independent este doar orientativă, întrucât testul ar trebui luat în considerare în combinație cu alte surse de informații în contextul unei IATA și în conformitate cu dispozițiile de

▼**M8**

la alineatele (7) și (8) din Introducerea generală. În plus, la evaluarea testelor care nu se bazează pe animale pentru sensibilizarea cutanată, ar trebui reținut faptul că este posibil ca testul LLNA și alte teste pe animale să nu reflecte pe deplin situația oamenilor.

4. Pe baza datelor disponibile, testul IL-8 Luc s-a dovedit a fi aplicabil substanțelor chimice de testat care acoperă o varietate de grupe organice funcționale, mecanisme de reacție, potență de sensibilizare cutanată (astfel cum a fost stabilit în cadrul studiilor *in vivo*), precum și proprietăți fizico-chimice (2) (6).

5. Deși testul IL-8 Luc utilizează X-VIVO™ 15 ca și solvent, prin acesta au fost evaluate în mod corect substanțele chimice având Log K_{ow} >3,5, precum și cele având o solubilitate în apă de aproximativ 100 μg/ml, astfel cum a fost calculată prin EPI Suite™, iar performanța acestuia de a detecta sensibilizantele cu o solubilitate mai scăzută în apă este mai bună decât a testului IL-8 Luc în care se utilizează dimetilsulfoxid (DMSO) ca și solvent (2). Însă rezultatele negative obținute în cazul substanțelor chimice de testat care nu se dizolvă în 20 mg/ml pot produce rezultate negative false din cauza incapacității acestora de a se dizolva în X-VIVO™ 15. Prin urmare, nu ar trebui să se ia în considerare rezultatele negative în cazul acestor substanțe chimice. În cadrul studiului de validare a fost observată o rată ridicată de rezultate negative false în cazul anhidridelor. În plus, din cauza capacității metabolice limitate a liniei celulare (8) și a condițiilor experimentale, este posibil ca prohaptenele (substanțe care necesită activare metabolică) și prehaptenele (substanțe activate prin oxidare cu aer) să genereze rezultate negative în cadrul testului. Cu toate acestea, deși rezultatele negative pentru prehaptene/prohaptene ar trebui să fie interpretate cu prudență, prin testul IL-8 Luc 11 din 11 prehaptene, 6/6 prohaptene și 6/8 prehaptene/prohaptene au fost estimate corect în cadrul setului de date pentru IL-8 Luc (2). Pe baza revizuirii cuprinzătoare efectuate recent asupra a trei teste care nu se bazează pe animale (DPRA, KeratinoSens™ și h-CLAT) pentru a detecta prehaptene și prohaptene (9) și pe baza faptului că celulele THP-G8 utilizate în testul IL-8 Luc constituie o linie celulară derivată din THP-1 care este utilizată în testul h-CLAT, testul IL-8 Luc poate contribui, de asemenea, la creșterea sensibilității testelor care nu se bazează pe animale pentru a detecta prehaptene și prohaptene în combinația cu alte teste. Surfactanții testați până la acest moment au generat rezultate pozitive (false) indiferent de tipul lor (de exemplu, cationic, anionic sau non-ionic). În cele din urmă, substanțele chimice care interferează cu luciferaza pot avea efecte asupra activității/măsurării acesteia, cauzând o inhibiție aparentă sau o creștere a luminiscenței (10). De exemplu, concentrațiile de fitoestrogen mai mari de 1 μM au fost raportate a interfera cu semnalele de luminiscență ale altor teste asupra genei raportoare bazate pe luciferază din cauza supraactivării genei raportoare pentru luciferază. În consecință, trebuie să se examineze cu atenție expresia luciferazei obținută la concentrații ridicate de fitoestrogeni sau compuși, care este suspectată de a produce o activare similară fitoestrogenilor a genei raportoare pentru luciferază (11). Pe baza considerațiilor de mai sus, surfactanții, anhidridele și substanțele chimice care interferează cu luciferaza sunt în afara domeniului de aplicabilitate al acestui test. În cazul în care există dovezi care demonstrează lipsa de aplicabilitate a testului IL-8 Luc la alte categorii specifice de substanțe chimice de testat, testul nu ar trebui utilizat pentru respectivele categorii specifice.

6. Conform descrierii de mai sus, testul IL-8 Luc susține diferențierea între sensibilizantele și nesensibilizantele pentru piele. Sunt necesare studii suplimentare, de preferat pe baza datelor umane, pentru a stabili dacă rezultatele testului IL-8 Luc pot contribui la evaluarea potenței atunci când sunt analizate împreună cu alte surse de informații.

▼M8

7. Definițiile sunt prevăzute în apendicele 3.1.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Testul IL-8 Luc utilizează o linie celulară monocitică umană afectată de leucemie THP-1 obținută de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, SUA). Utilizând această linie celulară, Departamentul de Dermatologie din cadrul Universității School of Medicine din Tohoku a stabilit o linie celulară raportoare IL-8 derivată din THP-1, denumită THP-G8, care poartă gene de luciferază Stable Luciferase Orange (SLO) și Stable Luciferase Red (SLR) sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, ai gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazei (GAPDH) (1). Acest lucru permite măsurarea cantitativă a inducției genei luciferază prin detectarea luminiscenței separat de lumina bine stabilită care produce substraturi de luciferază ca indicator al activității IL-8 și GAPDH la celule în urma expunerii la substanțe chimice sensibilizante.

9. Sistemul de testare cu două culori cuprinde o luciferază care emite culoarea portocalie (SLO; λmax = 580 nm) (12) pentru expresia genică a promotorului IL-8 și o luciferază care emite culoarea roșie (SLR; λmax = 630 nm) (13) pentru expresia genică a promotorului martorului intern, GAPDH. Cele două luciferaze care emit culori diferite la reacția cu firefly d-luciferin și luminiscența lor se măsoară simultan în cadrul unei reacții într-o singură etapă prin detașarea emisiilor de amestecul de testare cu ajutorul unui filtru optic (14) (apendicele 3.2).

10. Celulele THP-G8 sunt tratate timp de 16 ore cu substanța chimică de testat, după care se măsoară activitatea luciferazei SLO (SLOA-LA), care reflectă activitatea promotorului IL-8 și activitatea luciferazei SLR (SLR-LA), care reflectă activitatea promotorului GAPDH. Pentru a facilita înțelegerea abrevierilor, SLO-LA și SLR-LA sunt desemnate ca fiind IL8LA și, respectiv, GAPLA. Tabelul 1 prezintă o descriere a termenilor asociați activității luciferazei în cadrul testului IL-8 Luc. Valorile măsurate sunt utilizate pentru a calcula valoarea IL8LA normalizată (nIL8LA), care este raportul dintre IL8LA și GAPLA; inducția nIL8LA (Ind-IL8LA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale nIL8LA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor nIL8LA ale celulelor THP-G8 netratate; și inhibiția GAPLA (Inh-GAPLA), care este raportul dintre mediile aritmetice ale valorilor măsurate de patru ori ale GAPLA ale celulelor THP-G8 tratate cu o substanță chimică de testat și ale valorilor GAPLA ale celulelor THP-G8 netratate, utilizat ca indicator pentru citotoxicitate.

Tabelul 1

Descrierea termenilor asociați activității luciferazei în testul IL-8 Luc

Abrevieri	Definiție
GAPLA	Activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH
IL8LA	Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/nIL8LA a celulelor netratate

▼**M8**

Abrevieri	Definiție
Inh-GAPLA	GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice/GAPLA a celulelor netratate
CV05	Concentrația cea mai scăzută a substanței chimice la care Inh-GAPLA devine < 0,05.

11. Există standarde de performanță (PS) (15) pentru a facilita validarea testelor *in vitro* IL-8 ale luciferazei modificate, care sunt similare cu testul IL-8 Luc, și a permite modificarea promptă a Ghidului 442E al OCDE privind testele pentru includerea acestora. Sistemul de acceptare reciprocă a datelor (MAD) al OCDE va fi garantat doar pentru testele validate în conformitate cu PS, în cazul în care aceste teste au fost revizuite și incluse în Ghidul 442E al OCDE privind testele (16).

DEMONSTRAREA PERFORMANȚEI

12. Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice pentru metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice, utilizând cele 10 substanțe de verificare enumerate în apendicele 3.3, în conformitate cu bunele practici privind metodele *in vitro* (17). În plus, utilizatorii testelor ar trebui să mențină o bază de date istorice generate în urma verificărilor de reactivitate (a se vedea punctul 15) și cu martori pozitivi și tratați cu solvent/vehicul (a se vedea punctele 21-24) și să utilizeze aceste date pentru a confirma faptul că reproductibilitatea testului în laboratorul propriu este asigurată în timp.

PROCEDURA

13. Există procedura standard de operare (PSO) în cazul testului IL-8 Luc, care ar trebui utilizată la efectuarea testului (18). Laboratoarele care doresc să efectueze testul pot obține linia celulară recombinantă THP-G8 de la laboratorul GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia, la semnarea unui acord de transfer de material (ATM) în conformitate cu condițiile modelului OCDE. În paragrafele următoare sunt descrise componentele și procedurile principale ale testului.

Pregătirea celulelor

14. Linia celulară THP-G8 de la GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia ar trebui să fie utilizată pentru efectuarea testului IL-8 Luc (a se vedea punctele 8 și 13). La primire, celulele sunt multiplicate (2-4 pasaje) și păstrate înghețate ca stoc omogen. Celulele din acest stoc pot fi multiplicate până la maximum 12 treceri sau maximum 6 săptămâni. Mediul utilizat pentru multiplicare este mediul de cultură RPMI-1640 care conține 10 % ser fetal bovin (FBS), soluție antibiotică/antimicotică (100 U/ml de penicilină G, 100µg/ml de streptomicină și 0,25µg/ml de amfotericină B în 0,85 % soluție salină) (de exemplu, GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml Puromycin (de exemplu, CAS:58-58-2) și 300 µg/ml G418 (de exemplu, CAS:108321-42-2).

15. Înainte de a fi utilizate pentru testare, celulele ar trebui să fie calificate prin efectuarea unei verificări de reactivitate. Această verificare ar trebui efectuată la 1-2 săptămâni sau după 2-4 de pasaje de la decongelare, cu ajutorul martorului pozitiv, bromura 4-nitrobenzil (4-NBB), (CAS:100-11-8, cu puritate ≥ 99 %) și al martorului negativ, acidul lactic (AL) (CAS:50-21-5, cu o puritate ≥ 85 %). 4-NBB ar trebui să producă un răspuns pozitiv la Ind-IL8LA (≥ 1,4), iar AL ar trebui să producă un răspuns negativ la Ind-IL8LA (< 1,4). Sunt utilizate pentru test numai celulele pentru care verificarea de reactivitate a fost efectuată cu succes. Verificarea ar trebui să fie efectuată conform procedurilor descrise la punctele 22-24.

▼M8

16. În scopul testării, celulele THP-G8 sunt însămânțate la o densitate de 5×10^5 celule/ml și cultivate în prealabil în baloane de cultură timp de 48-96 de ore. În ziua testului, celule recoltate din balonul de cultură sunt spălate cu RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice, și apoi resuspendate în RPMI-1640 conținând 10 % FBS fără antibiotice la 1×10^6 celule/ml. Apoi, celulele sunt distribuite pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (de exemplu, Costar Cat#3603) de 50 µl (5×10^4 celule/godeu).

Pregătirea substanței chimice de testat și a substanțelor martor

17. Substanța chimică de testat și substanțele martor se pregătesc în ziua testării. Pentru testul IL-8 Luc, substanțele chimice de testat se dizolvă în X-VIVO™ 15, un mediu fără ser disponibil în comerț (Lonza, 04-418Q), până la concentrația finală de 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 se adaugă la 20 mg de substanță chimică de testat (indiferent de solubilitatea substanței chimice) într-o eprubetă de microcentrifugare și se aduce la un volum de 1 ml, apoi se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 ,°C. Apoi, dacă substanțele chimice solide sunt încă solide, eprubeta este supusă procesului sonic până când substanța chimică este dizolvată complet sau dispersată în mod stabil. Pentru substanțele chimice de testat solubile din X-VIVO™ 15, soluția este diluată cu un factor de 5 cu X-VIVO™ 15 și utilizată ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat (4 mg/ml). În cazul substanțelor chimice de testat care nu sunt solubile în X-VIVO™ 15, amestecul este rotit din nou timp de cel puțin 30 de minute, apoi centrifugat la 15000 rpm (≈ 20000*g*) timp de 5 minute; supernatantul rezultat este utilizat ca soluție mamă X-VIVO™ 15 a substanței chimice de testat. Utilizarea altor solvenți, cum ar fi DMSO, apă, sau mediu de cultură, ar trebui să fie justificată științific. Procedura detaliată pentru dizolvarea substanțelor chimice este prezentată în apendicele 3.5. Soluțiile X-VIVO™ 15 descrise la punctele 18-23 sunt amestecate 1:1 (v/v) cu suspensiile de celule preparate pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (a se vedea punctul 16).

18. Primul test are drept scop determinarea concentrației citotoxice și examinarea potențialului de sensibilizare cutanată al substanțelor chimice. Folosind X-VIVO™ 15, diluțiile în serie ale soluțiilor mamă X-VIVO™ 15 ale substanțelor chimice de testat sunt efectuate la factorul doi de diluție (a se vedea apendicele 3.5) folosind un bloc de analiză cu 96 de godeuri (de exemplu: Costar Cat#EW-01729-03). În continuare, se adaugă 50 µl de soluție diluată în fiecare godeu la 50 µl de suspensie celulară pe o placă de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Astfel, pentru substanțele chimice de testat care sunt solubile în X-VIVO™ 15, concentrațiile finale ale substanțelor chimice de testat variază între 0,002 și 2 mg/ml (apendicele 3.5). Pentru substanțele chimice de testat care nu sunt solubile în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml, se determină numai factorii de diluare care se încadrează între 2 și 2^{10}, deși concentrațiile finale reale ale substanțelor chimice de testat rămân incerte și depind de concentrația saturată a substanțelor chimice de testat din soluția mamă X-VIVO™ 15.

19. În cadrul testelor ulterioare (și anume, a doua, a treia și a patra replică), soluția mamă X-VIVO™ 15 este produsă la o concentrație de patru ori mai mare decât concentrația de viabilitate celulară 05 (CV05; cea mai scăzută concentrație la care Inh-GAPLA devine < 0,05) în primul experiment. Dacă Inh-GAPLA nu scade sub 0,05 la concentrația cea mai mare în cadrul primului test, soluția mamă X-VIVO™ 15 este preparată la cea mai ridicată concentrație a primului test. Concentrația CV05 se calculează împărțind concentrația soluției mamă din primul test la factorul de diluare pentru CV05 (X) [factorul de diluție CV05 (X); factorul de diluție necesar pentru diluarea soluției mamă la CV05) (a se vedea apendicele 3.5). În cazul substanțelor de testat care nu sunt solubile în X-VIVO la 20 mg/ml, CV05 este determinată prin concentrația soluției mamă × 1/X. Pentru testele 2-4, este preparată a doua soluție mamă ca 4 × CV05 (apendicele 3.5).

▼M8

20. Diluțiile în serie ale soluțiilor mamă de gradul doi X-VIVO™ 15 sunt realizate cu un factor de diluare de 1,5 utilizând un bloc de analiză cu 96 de godeuri. În continuare, se adaugă 50 µl de soluție diluată în fiecare godeu la 50 µl de suspensie celulară în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a fiecărei substanțe chimice de testat ar trebui să fie testată în patru godeuri. Eșantioanele sunt apoi amestecate pe un agitator cu placă și incubate timp de 16 ore la 37 °C și în soluție de 5 % CO_2, după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de mai jos.

21. Martorul tratat cu solvent este amestecul de 50 µl/godeu de X-VIVO™ 15 și de 50 µl/godeu de suspensie celulară în RPMI-1640 conținând 10 % FBS.

22. Martorul pozitiv recomandat este 4-NBB. Într-o eprubetă de microcentrifugare se prepară 20 mg de 4-NBB, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml. Eprubeta se rotește viguros și se agită pe un rotor la o viteză maximă de 8 rpm timp de 30 de minute. După centrifugare la 20000 g timp de 5 minute, supernatantul este diluat cu un factor de 4 în X-VIVO™ 15 și o cantitate de 500 µl de supernatant diluat se transferă într-un godeu din blocul de analiză cu 96 de godeuri. Supernatantul diluat este diluat în continuare în X-VIVO™ 15 la factori de 2 și 4 și se adaugă 50 µl de soluție la 50 µl de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci cu 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră (apendicele 3.6). Fiecare concentrație a martorului pozitiv ar trebui să fie testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO_2 timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.

23. Martorul negativ recomandat este AL. Se prepară 20 mg de AL într-o eprubetă de microcentrifugare de 1,5 ml, la care se adaugă X-VIVO™ 15 până la 1 ml (20 mg/ml). Se diluează 20 mg/ml de soluție AL cu un factor de 5 în X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl din această soluție AL de 4 mg/ml AL se transferă într-un godeu dintr-un bloc de analiză cu 96 de godeuri. Această soluție este diluată cu un factor de 2 în X-VIVO™ 15 și apoi diluată din nou cu un factor de 2 pentru a produce soluții de 2 mg/ml și 1 mg/ml. 50 µl din aceste trei soluții și martorul tratat cu vehicul (X-VIVO™ 15) se adaugă la 50 µl de suspensie celulară THP-G8 în godeurile unei plăci de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră. Fiecare concentrație a martorului negativ este testată în patru godeuri. Placa se agită pentru un agitator cu placă și se incubează într-un incubator cu CO_2 timp de 16 ore (37 °C, 5 % CO_2), după care se măsoară activitatea luciferazei conform descrierii de la punctul 29.

24. Ar putea fi utilizați și alți martori pozitivi sau negativi adecvați în cazul în care sunt disponibile date anterioare pentru a obține criterii comparabile de acceptare a testelor.

25. Ar trebui să se acorde o atenție deosebită pentru a se evita evaporarea substanțelor chimice de testat volatile și contaminarea încrucișată între godeuri a substanțelor chimice de testat, de exemplu, prin acoperirea etanșă a plăcilor înainte de incubația cu substanțele chimice de testat.

26. Substanțele chimice de testat și martorul tratat cu solvent necesită efectuarea a 2-4 teste pentru obținerea unei estimări pozitive sau negative (a se vedea tabelul 2). Fiecare test independent este efectuat într-o altă zi cu soluții mamă X-VIVO™ 15 proaspete ale substanțelor chimice de testat și celule recoltate în mod independent. Celulele pot proveni din cadrul aceleiași treceri.

▼M8

Măsurători de activitate ale luciferazei

27. Luminiscența este măsurată cu ajutorul unui luminometru cu o microplacă de 96 de godeuri dotat cu filtre optice, de exemplu, Phelios (ATTO, Tokyo, Japonia), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germania) și seria ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Luminometrul trebuie calibrat pentru fiecare test pentru a se asigura reproductibilitatea (19). Pentru această calibrare sunt disponibile luciferaze recombinante de culoarea portocalie și roșie.

28. Se transferă 100 µl de reactiv preîncălzit Tripluc® Luciferase (Tripluc) prevăzut pentru test în fiecare godeu al plăcii care conține suspensia celulară tratată cu sau fără substanță chimică. Placa se agită timp de 10 minute la o temperatură ambiantă de aproximativ 20 °C. Placa se plasează în luminometru pentru măsurarea activității luciferazei. Bioluminiscența se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic. Ar trebui să se furnizeze o justificare pentru utilizarea de valori alternative, de exemplu, în funcție de modelul de luminometru utilizat.

29. Parametrii pentru fiecare concentrație sunt calculați de la valorile măsurate, de exemplu, IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, media ±SD a IL8LA, media ±SD a GAPLA, media ±SD a nIL8LA, media ±SD a Ind-IL8LA, media ±SD a Inh-GAPLA și intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA. Definițiile parametrilor utilizați în prezentul punct sunt prevăzute în apendicele 3.1 și 3.4.

30. Înainte de măsurare, diferențierea culorilor în cadrul testelor de raportare a mai multor culori este realizată, în general, cu ajutorul detectoarelor (luminometrul și cititorul plăcii) prevăzute cu filtre optice, precum filtrele de tip „sharp-cut” (cu trecere lungă sau cu trecere scurtă) sau filtrele „trece banda”. Coeficienții de transmitere ai filtrelor pentru fiecare culoare a semnalului bioluminiscenței ar trebui calibrați înainte de testare, conform apendicelui 3.2.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea datelor

31. Criteriile pentru o decizie pozitivă/negativă impun ca în cadrul fiecărui test:

— o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind pozitivă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA $\geq$ 1,4 și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA $\geq$ 1,0

— o estimare a unui test IL-8 Luc să fie apreciată ca fiind negativă dacă o substanță chimică de testat are o valoare Ind-IL8LA $<$ 1,4 și limita inferioară a intervalului de încredere de 95 % al Ind-IL8LA $<$ 1,0

Model predictiv

32. Substanțele chimice de testat care generează două rezultate pozitive la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate ca fiind pozitive, iar cele care generează trei rezultate negative la testele 1, 2, 3 sau 4 sunt identificate și presupuse ca fiind negative (tabelul 2). Între presupusele substanțe chimice negative, substanțele chimice care sunt dizolvate la cantitatea de 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 sunt estimate ca fiind negative, iar substanțele chimice care nu sunt dizolvate la 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 nu ar trebui să fie luate în considerare (figura 1).

▼M8

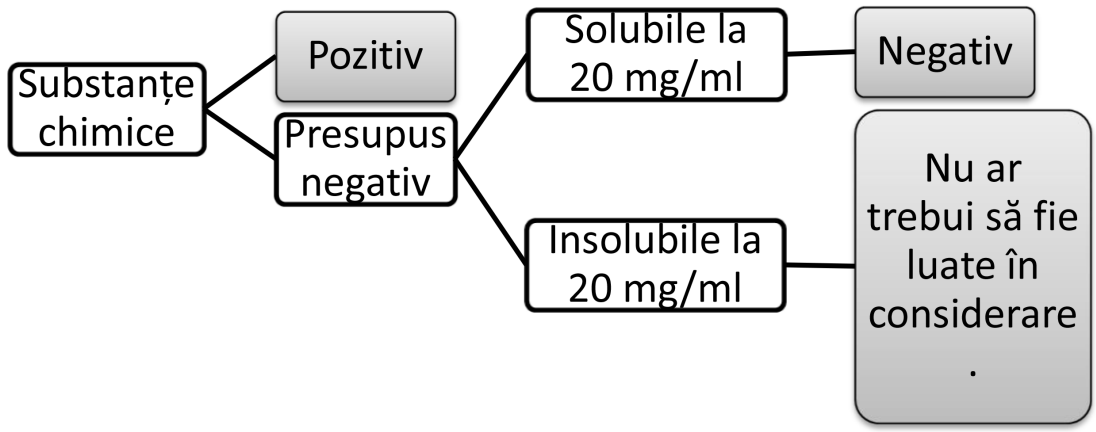
Tabelul 2

Criterii de identificare a rezultatelor pozitive și a celor presupuse drept negative

testul 1	testul 2	testul 3	testul 4	Estimare finală
Pozitiv	Pozitiv	–	–	Pozitiv
	Negativ	Pozitiv	–	Pozitiv
		Negativ	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
Negativ	Pozitiv	Pozitiv	–	Pozitiv
		Negativ	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
	Negativ	Pozitiv	Pozitiv	Pozitiv
			Negativ	Presupus negativ
		Negativ	–	Presupus negativ

Figura 1

Model predictiv pentru estimarea finală



Criterii de acceptare

33. Atunci când se utilizează testul IL-8, ar trebui să fie îndeplinite următoarele criterii de acceptare:

— Ind-IL8LA trebuie să fie peste 5,0 cel puțin într-o concentrație a martorului pozitiv, 4-NBB, în cadrul fiecărui test.

— Ind-IL8LA ar trebui să fie sub 1,4 în orice concentrație a martorului negativ, acidul lactic, în cadrul fiecărui test.

— Datele provenind din plăcile pentru care valoarea GAPLA din godeurile cu martor cu celule și Tripluc, dar fără substanțe chimice, este mai mică decât valoarea echivalentă a de cinci ori valoarea godeului conținând doar mediul de testare (50 µl/godeu de RPMI-1640 conținând 10 % FBS și 50 µl/godeu X-VIVO™ 15) ar trebui să fie respinse.

— Datele provenind din plăcile pentru care valoarea Inh-GAPLA a tuturor concentrațiilor substanțelor chimice de testat sau martor este mai mică de 0,05 ar trebui să fie respinse. În acest caz, primul test ar trebui repetat astfel încât cea mai mare concentrație finală a testului repetat să fie cea mai scăzută concentrație finală a testului anterior.

▼M8

Raportul testului

34. Raportul testului ar trebui să includă următoarele informații:

Substanțele chimice de testat

Substanță monocomponentă:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Solubilitatea în X-VIVO™ 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO™ 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO™ 15.

Substanța multicomponentă, UVCB și amestec:

— Caracterizarea, dacă este posibil, de exemplu prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), puritatea, apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea mai sus) ale componentelor, dacă există;

— Aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există;

— Masa moleculară sau masa moleculară aparentă în cazul amestecurilor/polimerilor cu compoziții cunoscute sau alte informații relevante pentru efectuarea studiului;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Solubilitatea în X-VIVO™ 15. În cazul substanțelor chimice insolubile în X-VIVO™ 15, dacă este respectată precipitarea sau flotația după centrifugare;

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există.

— Justificarea alegerii solventului/vehiculului pentru fiecare substanță chimică de testat dacă nu a fost utilizat X VIVO™ 15.

Martori

Martor pozitiv:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) SMILES sau codul InChI, formula structurală și/sau alți identificatori;

— aspectul fizic, solubilitatea în apă, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante, dacă există și dacă este cazul;

▼M8

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— Tratamentul înainte de efectuarea testului, dacă este cazul (de exemplu, încălzire, măcinare);

— Concentrația (concentrațiile) testată(e);

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Trimitere la rezultatele anterioare ale martorilor pozitivi care demonstrează criterii adecvate de acceptare, dacă este cazul.

Martor negativ:

— Identificarea chimică, precum denumirea (denumirile) IUPAC sau CAS, numărul (numerele) CAS și/sau alți identificatori;

— puritatea, identitatea chimică a impurităților, după caz și dacă este fezabil din punct de vedere practic etc.;

— aspectul fizic, masa moleculară și alte proprietăți fizico-chimice relevante în cazul în care sunt utilizați alți martori negativi decât cei menționați în Ghidul pentru teste și dacă aceștia există;

— Condițiile de depozitare și stabilitatea, dacă există;

— Justificarea alegerii solventului pentru fiecare substanță chimică de testat.

Condiții de testare

— Numele și adresa sponsorului, ale instalației de testare și ale directorului de studiu;

— descrierea testului utilizat;

— linia celulară utilizată, condițiile de depozitare și sursa acesteia (de exemplu, instalația de la a fost obținută aceasta);

— numărul lotului și originea FBS, denumirea furnizorului, numărul lotului de pe placa de 96 de godeuri cu fund plat de culoare neagră și numărul lotului reactivului Tripluc;

— numărul de trecere și densitatea celulară utilizate pentru testare;

— metoda utilizată pentru numărarea celulelor pentru însămânțare înainte de testare și măsurile luate pentru a asigura distribuția omogenă a numărului de celule;

— luminometrul utilizat (de exemplu, modelul), inclusiv reglajele aparatului, substratul de luciferază utilizat, precum și demonstrarea măsurătorilor corespunzătoare ale luminiscenței pe baza testului de control descris la apendicele 3.2;

— procedura utilizată pentru a demonstra performanțele de laborator la efectuarea testului (de exemplu, prin testarea unor substanțe de verificare) sau pentru a demonstra performanța reproductibilă a testului în timp.

Procedura de testare

— numărul de replici și teste efectuate;

— concentrațiile substanței chimice de testat, procedura de aplicare și timpul de expunere utilizate (în cazul în care acestea diferă de cele recomandate);

▼**M8**

— Descrierea criteriilor de evaluare și de decizie utilizate;

— descrierea criteriilor de acceptare a studiului utilizate;

— Descrierea oricăror modificări ale procedurii de testare.

Rezultate

— măsurătorile IL8LA și GAPLA;

— calculele pentru nIL8LA, Ind-IL8LA și Inh-GAPLA;

— intervalul de încredere de 95 % al Ind-IL8LA;

— un grafic care descrie curbele de răspuns în funcție de doză pentru inducția activității luciferazei și viabilitate;

— O descriere a oricăror alte observații relevante, dacă este cazul.

Discutarea rezultatelor

— Discutarea rezultatelor obținute cu ajutorul testului IL-8 Luc;

— Analiza rezultatelor testului în contextul unei IATA în cazul în care sunt disponibile alte informații relevante.

Concluzii

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K și Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OCDE (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OCDE (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H și Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y și Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N și Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A și Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J și Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OCDE (2016). Testul nr. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M și Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ și Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M și Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OCDE (2017). Urmează a se publica - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCDE, Paris, Franța

(16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCDE, Paris, Franța.

(17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris. Publicație disponibilă la adresa: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Publicație disponibilă la adresa: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR și Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCDE, Paris, Franța.

(21) Organizația Națiunilor Unite (2015). Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice (GHS). A șasea ediție revizuită. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Material disponibil la adresa: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Apendicele 3.1

DEFINIțII

Precizie: Gradul de concordanță între rezultatele testului și valorile de referință acceptate. Aceasta măsoară performanța testului și unul dintre aspectele relevanței acestuia. Termenul este adesea utilizat în mod interschimbabil, iar concordanța înseamnă proporția de rezultate corecte ale unui test (16).

AOP (parcursul răspunsurilor adverse): o serie de evenimente din structura chimică a unei substanțe chimice țintă sau un grup de substanțe chimice similare, de la evenimentul molecular declanșator până la un răspuns *in vivo* de interes (20).

Substanță chimică: O substanță sau un amestec.

CV05: Viabilitatea celulară 05, și anume concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.

FInSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Ind-IL8LA. Pentru definiție, a se vedea Ind-IL8LA.

GAPLA: Activitatea luciferazei Stable Luciferase Red (SLR) (λ max = 630 nm), reglementată de promotorul GAPDH, care demonstrează viabilitatea celulară și numărul de celule viabile.

Pericol: Proprietate intrinsecă a unui agent sau a unei situații care are potențialul de a produce efecte adverse atunci când un organism, un sistem sau o (sub)populație este expusă la agentul respectiv.

IATA (Strategie integrată pentru testare și evaluare): O abordare structurată utilizată pentru identificarea pericolelor (potențial), caracterizarea pericolelor (potența) și/sau evaluarea siguranței (potențial/potență și expunere) pentru o substanță chimică sau un grup de substanțe chimice, care se integrează în mod strategic și măsoară toate datele relevante pentru a furniza informații cu privire la decizii de reglementare în ceea ce privește potențialele pericole și/sau riscuri și/sau necesitatea unor teste suplimentare specifice și, prin urmare, minime.

II-SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la Inh-GAPLA. Pentru definiție, a se vedea Inh-GAPLA.

IL-8 (Interleukin-8): O citokină derivată din celulele endoteliale, fibroblaste, cheratinocite, macrofage și monocite care cauzează chemotaxia neutrofilelor și a și a limfocitelor T.

IL8LA: Activitate luciferazei Stable Luciferase Orange (SLO) (λmax = 580 nm), reglementată de promotorul IL-8.

Ind-IL8LA: Inducția în multipli a nIL8LA. Se obține prin împărțirea valorii nIL8LA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 nestimulate și reprezintă inducția activității promotorului IL-8 prin intermediul substanțelor chimice.

Inh-GAPLA: Inhibarea GAPLA. Se obține prin împărțirea valorii GAPLA a celulelor THP-G8 tratate cu substanțe chimice la valoarea celulelor THP-G8 netratate și reprezintă citotoxicitatea substanțelor chimice.

Prag minim de inducție (PMI): concentrația cea mai scăzută la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive

▼M8

Amestec: un amestec sau o soluție compus/ă din două sau mai multe substanțe.

Substanță monocomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care un singur component principal este prezent în proporție de cel puțin 80 % (g/g).

Substanță multicomponentă: O substanță definită prin compoziția sa cantitativă, în care există mai multe componente principale într-o concentrație ≥ 10 % (g/g) și < 80 % (g/g). O substanță multicomponentă este rezultatul unui proces de fabricație. Diferența dintre un amestec și o substanță multicomponentă este faptul că un amestec este obținut prin combinarea a două sau mai multe substanțe chimice fără o reacție chimică. O substanță multicomponentă este rezultatul unei reacții chimice.

nIL8LA: Activitatea luciferazei SLO care reflectă activitatea promotorului IL-8 (IL8LA), normalizată prin activitatea luciferazei SLR care reflectă activitatea promotorului GAPDH (GAPLA). Aceasta reprezintă o activitate a promotorului IL-8 după analizarea viabilității celulare sau a numărului de celule.

nSLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la nIL8LA. Pentru definiție, a se vedea nIL8LA.

Martor pozitiv: O replică ce conține toate componentele sistemului de testare și care a fost tratată cu o substanță cunoscută pentru faptul că provoacă o reacție pozitivă. Pentru a asigura posibilitatea evaluării variabilității în timp a reacției martorului pozitiv, amplitudinea reacției severe nu trebuie să fie excesiv de mare.

Prehaptene: Substanțe chimice care devin sensibilizante prin transformări abiotice.

Prohaptene: Substanțe chimice care necesită activare enzimatică pentru a exercita potențialul de sensibilizare cutanată.

Relevanță: Descrierea relației dintre test și efectul de interes și dacă aceasta este relevantă și utilă pentru un anumit scop. Aceasta reprezintă măsura în care testul măsoară sau prezice în mod corect efectul biologic de interes. Relevanța include analiza preciziei (a concordanței) unui test (16).

Fiabilitate: Măsuri ale faptului că un test poate fi efectuat în mod reproductibil, în același laborator și în laboratoare diferite în timp, atunci când este efectuat utilizând același protocol. Aceasta se evaluează prin calcularea reproductibilității în același laborator sau între laboratoare și a repetabilității în același laborator (16).

Test: Un test este compus din unul sau mai multe substanțe chimice de testat, care sunt testate concomitent cu un martor solvent/vehicul și un martor pozitiv.

Sensibilitate: Proporția tuturor substanțelor chimice pozitive/active clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

SLO-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la IL8LA. Pentru definiție, a se vedea IL8LA.

SLR-LA: Abrevierea utilizată în raportul de validare și în publicațiile anterioare privind testul IL-8 Luc referitor la GAPLA. Pentru definiție, a se vedea GAPLA.

▼M8

Martor solvent/vehicul: O probă netratată care conține toate componentele unui sistem de testare, cu excepția celor ale substanței chimice de testat, dar incluzând solventul/vehiculul utilizat. Acesta este utilizat pentru a stabili reacția de bază pentru probele tratate cu substanța chimică de testat dizolvată sau dispersată stabil în același solvent/vehicul. Atunci când este testată concomitent cu un martor de mediu, această probă indică, de asemenea, dacă solventul/vehiculul interacționează cu sistemul testat.

Specificitate: Proporția tuturor substanțelor chimice negative/inactive clasificate în mod corect în urma testului. Aceasta permite măsurarea preciziei în cazul unui test care generează rezultate clasificabile în categorii și constituie un aspect important în evaluarea relevanței unui test (16).

Substanță: Un element chimic și compușii acestuia în stare naturală sau obținut prin orice proces de producție, inclusiv orice aditiv necesar pentru a menține stabilitatea produsului și orice impuritate rezultată din procesul utilizat, dar cu excepția oricărui solvent care poate fi separat fără a influența stabilitatea substanței sau fără a schimba compoziția acesteia.

Surfactant: Numit și agent tensioactiv, aceasta este o substanță, cum ar fi un detergent, care poate să reducă tensiunea la suprafață a unui lichid și, astfel, să îi permită acesteia spumarea sau penetrarea solidelor; este cunoscut, de asemenea, ca agent de umectare. (TG437)

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat(ă) în cadrul acestei metode.

THP-G8: O linie celulară raportoare IL-8 utilizată în cadrul testului IL-8 Luc. Linia celulară THP-1 similară macrofagului uman a fost transfectată în genele pentru luciferază SLO și SLR sub controlul promotorilor IL-8 și, respectiv, GAPDH.

Sistemul global armonizat de clasificare și etichetare a substanțelor chimice al Organizației Națiunilor Unite (GHS al ONU): Un sistem care propune clasificarea substanțelor chimice (substanțe și amestecuri) în funcție de tipuri și niveluri standardizate de pericole fizice, pericole pentru sănătate și pericole pentru mediu și care se referă la elemente de comunicare corespunzătoare, precum pictograme, cuvinte de avertizare, declarații cu privire la pericole, declarații de securitate și fișe tehnice de siguranță pentru a transmite informații privind efectele adverse ale acestora în scopul protejării populației (inclusiv angajatorii, lucrătorii, transportatorii, consumatorii și cei care se ocupă de serviciile de urgență) și a mediului (21).

UVCB: Substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

Metodă de testare valabilă: Un test considerat a avea suficientă relevanță și fiabilitate pentru un scop specific și care se bazează pe principii solide din punct de vedere științific. Un test nu este niciodată valabil într-un sens absolut, ci doar în legătură cu un scop definit.

▼**M8**

Apendicele 3.2

PRINCIPIUL MĂSURĂRII ACTIVITĂțII LUCIFERAZEI șI AL DETERMINĂRII COEFICIENțILOR DE TRANSMISIE AI FILTRULUI OPTIC PENTRU SLO ȘI SLR

Se poate utiliza MultiReporter Assay System - Tripluc - cu un luminometru de tip microplacă prevăzut cu un sistem de detectare a mai multor culori, care poate fi montat la un filtru optic [de exemplu, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. Filtrul optic utilizat pentru măsurare este un filtru de 600-620 nm cu trecere lungă sau scurtă, sau un filtru de 600-700 nm de tip band pass.

Măsurarea luciferazelor în două culori cu un filtru optic.

Acesta este un exemplu folosind filtrul Phelios AB-2350 (ATTO). Acest luminometru este prevăzut cu un filtru de 600 nm cu trecere lungă (R60 HOYA Co., de 600 nm LP, filtrul nr. 1) pentru scindarea luminiscenței SLO (λmax = 580 nm) și SLR (λmax = 630 nm).

Pentru a determina coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm, folosind enzime purificate pentru luciferază SLO și SLR, măsurați mai întâi i) intensitatea bioluminiscenței SLO și SLR fără filtru (F0) și ii) intensitatea bioluminiscenței SLO și SLR care a trecut prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) și iii) calculați coeficienții de transmitere ai filtrului LP de 600 nm pentru SLO și SLR care sunt menționați în continuare.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Atunci când intensitatea SLO și SLR în eșantion este definită ca O și, respectiv, R, i) intensitatea luminii fără filtru (complet optic) F0 și ii) intensitatea luminii care transmite prin filtrul LP de 600 nm (filtrul 1) F1 sunt descrise mai jos.

$F0=O+R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Aceste formule ar putea fi reformulate, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Apoi, folosind factorii de transmitanță calculați (κO_{R60} și κR_{R60}) și având valorile F0 și F1 măsurate, puteți calcula valoarea O și R, după cum urmează:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Materiale și metode pentru determinarea factorului de transmitanță

(1) Reactivi

Enzime simple purificate luciferaze:

Enzima SLO purificată liofilizată

Enzima SLR purificată liofilizată

(care, pentru activitatea de validare, au fost obținute de la laboratorul LMP Lab. Co. Ltd., Tottori, Japonia cu linia celulară THP-G8)

Reactiv pentru testare:

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (spre exemplu, de la TOYOBO Cat#MRA-301)

Mediu: pentru testul luciferazei (30 ml, stocat la 2-8 °C)

Concentr.	reactivului	Concentrație finală în mediu	Cantitate necesară
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

(2) Prepararea soluției enzimatice

Se dizolvă o enzimă luciferază purificată lipofilizată în eprubetă, adăugând 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl sau Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0), se completează cu glicerol în proporție de 10 % (g/v), se împarte soluția enzimei în alicote de 10 µl în eprubete de unică folosință de 1,5 ml și se depozitează într-un congelator la -80 °C. Soluția enzimatică înghețată poate fi utilizată timp de maxim șase luni. La utilizare, se adaugă 1 ml de mediu pentru testul luciferazei (RPMI-1640 cu 10 % FBS) în fiecare eprubetă care conține soluțiile enzimatice (soluție enzimatică diluată) și se păstrează pe gheață pentru a preveni dezactivarea.

(3) Măsurarea bioluminiscenței

Reactivul pentru testare Tripluc® Luciferase (Tripluc) se decongelează și se păstrează la temperatura camerei, fie într-o baie de apă, fie la temperatura ambiantă. Se activează luminometrul cu 30 de minute înainte de începerea măsurătorii pentru a permite stabilizarea fotomultiplicatorului. Se transferă 100 µl de soluție enzimatică diluată pe o placă cu 96 de godeuri de culoare neagră (cu fund plat) (eșantion de referință SLO pentru #B1, #B2 și #B3 și eșantionul de referință SLR pentru #D1, #D2, #D3). Se transferă apoi 100 µl de Tripluc preîncălzit în fiecare godeu al plăcii care conține soluția enzimatică diluată, folosind o pipetă. Se agită placa timp de 10 minute la temperatura camerei (aproximativ 25 °C) folosind un agitator pentru placă. Dacă apar bule în soluțiile din godeuri acestea sunt eliminate. Se așază placa în luminometru pentru a măsura activitatea luciferazei. Bioluminiscența se măsoară timp de 3 secunde fiecare în absența (F0) și prezența (F1) filtrului optic.

Coeficientul de transmisie al filtrului optic a fost calculat după cum urmează:

Coeficientul de transmisie [SLO (κO_{R60})] = (#B1 al F1+ #B2 al F1+ #B3 al F1) / (#B1 al F0+ #B2 al F0+ #B3 al F0)

▼**M8**

Coeficientul de transmisie [SLR (κR_{R60})] = (#D1 al F1+ #D2 al F1+ #D3 al F1) / (#D1 al F0+ #D2 al F0+ #D3 al F0)

Factorii de transmitanță calculați se utilizează pentru toate măsurătorile efectuate folosind același luminometru.

Controlul calității echipamentului

Ar trebui să fie utilizate procedurile descrise în protocolul IL-8 Luc (18).

▼M8

Apendicele 3.3

SUBSTANȚE DE VERIFICARE

Înainte de utilizarea de rutină a testului descris în prezentul apendice la metoda de testare B.71, laboratoarele ar trebui să demonstreze performanțele tehnice prin obținerea estimării în urma testului IL-8 Luc pentru cele nouă substanțe recomandate în tabelul 1 și prin obținerea de valori care să se încadreze în plaja de valori de referință corespunzătoare pentru cel puțin opt dintre cele nouă substanțe de verificare (selectate pentru a reprezenta intervalul de răspunsuri pentru pericolele de sensibilizare cutanată). Alte criterii de selecție au fost ca substanțele să fie disponibile în comerț și să fie disponibile date de referință *in vivo* de înaltă calitate, precum și date *in vitro* de înaltă calitate generate cu testul IL-8 Luc. De asemenea, sunt disponibile date de referință publicate pentru testul IL-8 Luc (6) (1).

Tabelul 1

Substanțe recomandate pentru demonstrarea performanțelor tehnice cu testul IL-8 Luc

Substanțe de verificare	Nr. CAS	Stare	Solubilitate în X-VIVO15 la 20 mg/ml	Estimarea *in vivo* (1)	Estimarea IL-8 Luc (2)	Interval de referință (µg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	**IL-8 Luc MIT (5)**
2,4-dinitroclorbenzen	97-00-7	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Extrem)	Pozitiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehidă	50-00-0	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Puternic)	Pozitiv	9-30	4-9
2-mercaptobenzotiazol	149-30-4	Solid	Insolubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	250-290	60-250
Etilendiamină	107-15-3	Lichid	Solubil	Sensibilizant (Moderat)	Pozitiv	500-700	0,1-0,4
Etilen glicol dimetacrilat	97-90-5	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,04-0,1
4-alilanisol (Estragol)	140-67-0	Lichid	Insolubil	Sensibilizant (Slab)	Pozitiv	>2000	0,01-0,07
Streptomicină sulfat	3810-74-0	Solid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Glicerină	56-81-5	Lichid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000
Izopropanol	67-63-0	Lichid	Solubil	Non-sensibilizant	Negativ	>2000	>2000

Abrevieri: Nr. CAS = Număr de înregistrare al Chemical Abstracts Service
(1) Potența *in vivo* este derivată pe baza criteriilor propuse de ECETOC (19).
(2) Pe baza valorilor anterioare observate (1) (6).
(3) Valorile CV_{05} și IL-8 Luc MIT au fost calculate folosind solubilitatea în apă dată de EPI Suite™.
(4) CV_{05}: concentrația minimă la care substanțele chimice prezintă o valoare Inh-GAPLA mai mică de 0,05.
(5) MIT: concentrațiile cele mai scăzute la care o substanță chimică îndeplinește criteriile pozitive.

▼M8

Apendicele 3.4

INDICI ŞI CRITERII DE APRECIERE

nIL8LA (nSLO-LA)

Repetarea j-th (j = 1-4) a concentrației i-th (i = 0-11) se măsoară pentru IL8LA (SLO-LA) și, respectiv, GAPLA (SLR-LA). Valoarea IL8LA normalizată, denumită nIL8LA (nSLO-LA) și definită ca:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$

Aceasta este unitatea de măsură de bază în cadrul acestui test.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Creșterea în multipli a mediei nIL8LA (nSLO-LA) pentru repetiția la concentrația i-th, în comparație cu aceasta la concentrația 0, Ind-IL8LA, reprezintă principala măsură a acestui test. Acest coeficient este scris prin următoarea formulă:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

Laboratorul principal a propus ca o valoare de 1,4 să corespundă unui rezultat pozitiv pentru substanța chimică testată. Această valoare este bazată pe examinarea datelor istorice ale laboratorului principal. Echipa de gestionare a datelor a utilizat apoi această valoare în toate etapele studiului de validare. Rezultatul principal, Ind-IL8LA, constituie raportul dintre două medii aritmetice, astfel cum se arată în ecuație.

Interval de încredere de 95 % (CI 95 %)

Intervalul de încredere de 95 % (CI 95 %), care este bazat pe coeficient, poate fi estimat pentru a indica precizia măsurării acestui rezultat principal. Limita inferioară a CI de 95 % ≥ 1 indică faptul că valoarea nIL8LA cu o concentrație i-th este semnificativ mai mare decât cea cu martor tratat cu solvent. Există mai multe modalități de a construi CI de 95 %. În acest studiu am utilizat metoda cunoscută drept teorema lui Fieller. Această teoremă privind intervalul de încredere de 95 % este obținută din următoarea formulă:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

Unde .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$is 97.5 percentile din distribuția t centrală cu ν grade de libertate, unde

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Valoarea Inh-GAPLA reprezintă un coeficient al mediei GAPLA (SLR-LA) pentru repetarea concentrației i-th în comparație cu cea cu martor tratat cu solvent, iar aceasta este scrisă prin

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

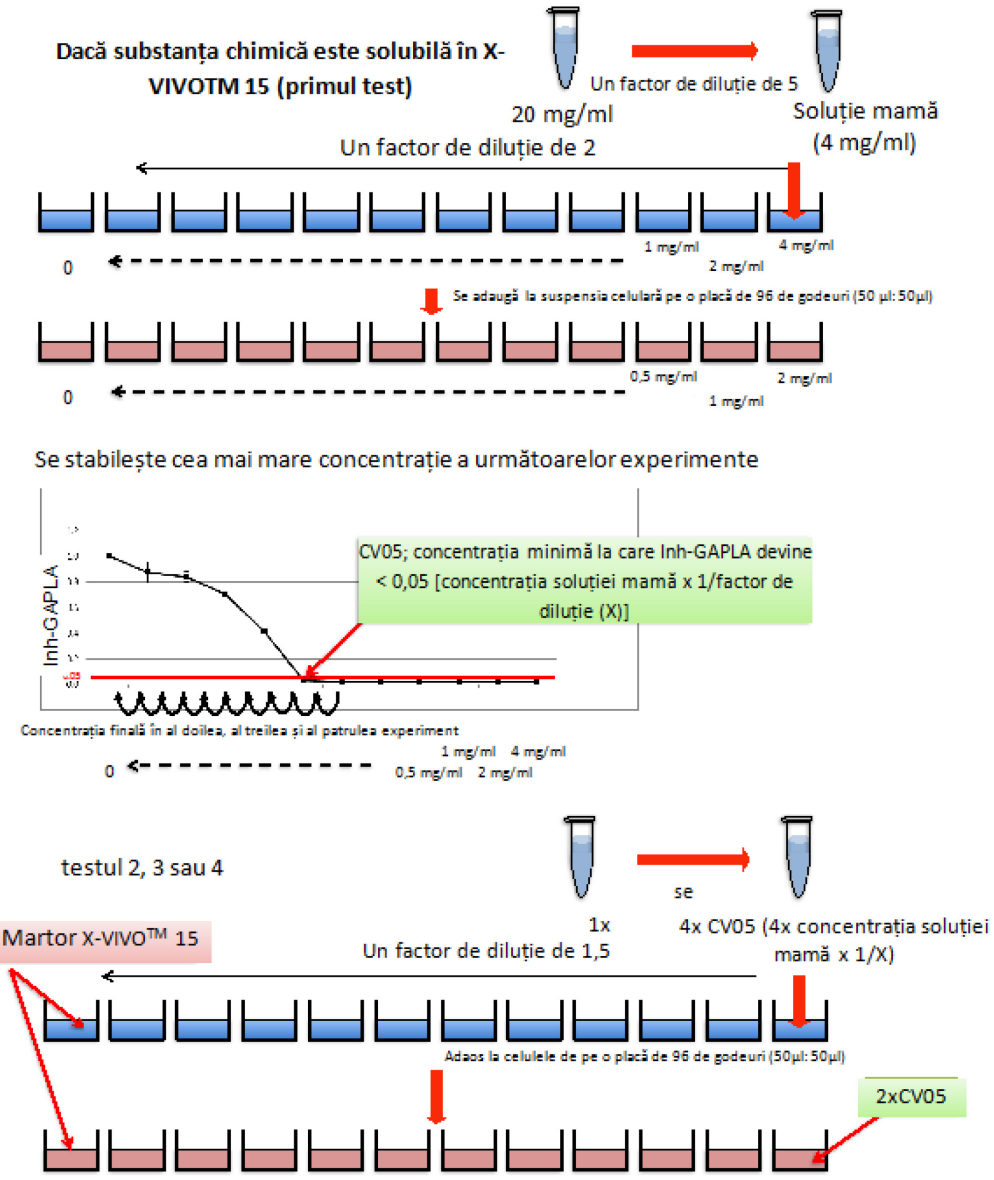
Întrucât valoarea GAPLA este numitorul nIL8LA, o valoare extrem de mică determină o variație mare a valorii nIL8LA. Prin urmare, valorile Ind-IL8LA având o valoare extrem de mică a Inh-GAPLA (sub 0,05) ar putea fi considerate a reprezenta un nivel scăzut de precizie.

▼**M8**

Apendicele 3.5

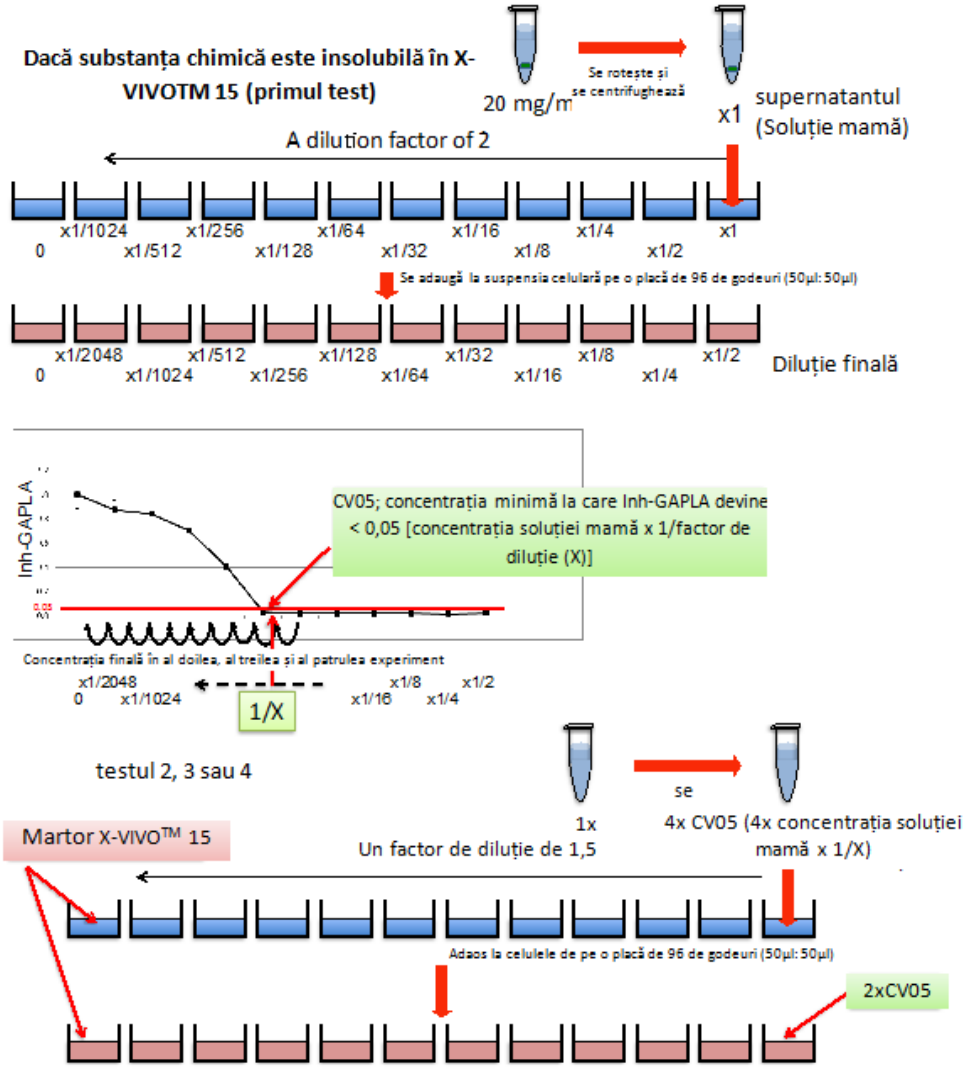
SCHEMA METODELOR DE DIZOLVARE A SUBSTANȚELOR CHIMICE PENTRU TESTUL IL-8 LUC.

(a) Pentru substanțele chimice dizolvate în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml



▼**M8**

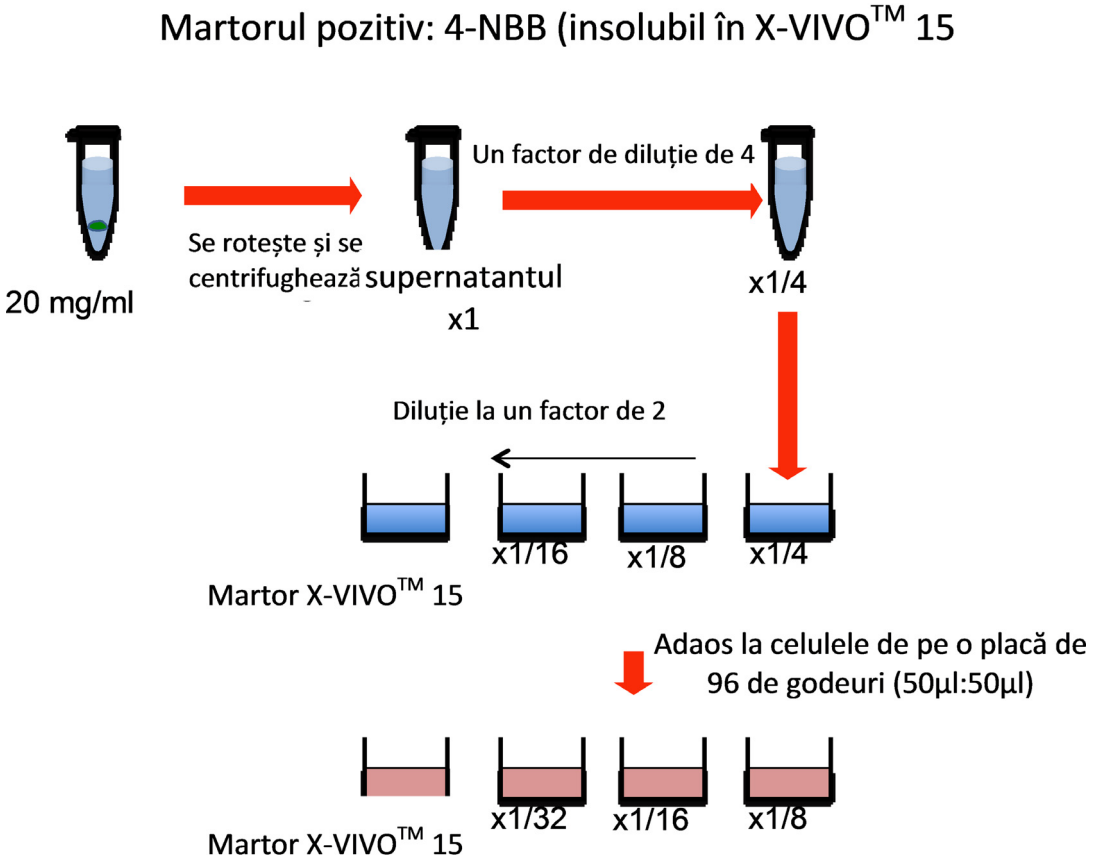
(b) Pentru substanțele chimice insolubile în X-VIVO™ 15 la 20 mg/ml



▼**M8**

Apendicele 3.6

SCHEMA METODEI DE DIZOLVARE A 4-NBB PENTRU MARTORUL POZITIV AL TESTULUI IL-8 LUC.



▼B

PARTEA C: METODE PENTRU DETERMINAREA ECOTOXICITĂȚII

CUPRINS

C.1. TOXICITATEA ACUTĂ LA PEȘTI

C.2. *DAPHNIA* SP. TESTUL IMOBILIZĂRII ACUTE

C.3. ALGE DE APĂ DULCE ȘI CIANOBACTERII, TEST DE INHIBARE A CREȘTERII

C.4. DETERMINAREA BIODEGRADABILITĂȚII „RAPIDE”

PARTEA I. CONSIDERAȚII GENERALE

PARTEA II. TESTUL DE EPUIZARE COD (Metoda C.4-A)

PARTEA III. TESTUL DE SCREENING MODIFICAT OCDE (Metoda C.4-B)

PARTEA IV. TESTUL DE DEGAJARE A CO_2 (Metoda C.4-C)

PARTEA V. TESTUL DE RESPIROMETRIE MANOMETRICĂ (Metoda C.4-D)

PARTEA VI. TESTUL CU VAS ÎNCHIS (Metoda C.4-E)

PARTEA VII. TESTUL MITI (METODA C.4-F)

C.5. DEGRADAREA – CONSUMUL BIOCHIMIC DE OXIGEN

C.6. DEGRADAREA – CONSUMUL CHIMIC DE OXIGEN

C.7. DEGRADAREA – DEGRADAREA ABIOTICĂ: HIDROLIZA CA O FUNCȚIE A PH-ULUI

C.8. TOXICITATEA LA RÂME

C.9. BIODEGRADARE – METODA ZAHN-WELLENS

C.10. TEST DE SIMULARE – TRATAREA AEROBĂ A APELOR UZATE: C.10-A: UNITĂȚI CU NĂMOL ACTIV – C.10-B: BIOPELICULE

C.11. NĂMOL ACTIV, TEST DE INHIBARE A RESPIRAȚIEI (OXIDAREA CARBONULUI ȘI A AMONIULUI)

C.12. BIODEGRADARE – TESTUL SCAS MODIFICAT

C.13. BIOACUMULAREA LA PEȘTI: EXPUNEREA PRIN APĂ ȘI PRIN ALIMENTAȚIE

C.14. TESTUL DE CREȘTERE A PUIETULUI DE PEȘTE

C.15. PEȘTII, TESTUL DE TOXICITATE PE TERMEN SCURT ÎN STADIILE DE EMBRION ȘI DE ALEVIN

C.16. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ

C.17. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PRIN CONTACT

C.18. ADSORBȚIA/DESORBȚIA PRINTR-O METODĂ DE STABILIRE A ECHILIBRULUI PROBELOR

▼B

C.19.	ESTIMAREA COEFICIENTULUI DE ADSORBȚIE (K_{CO}) PE SOL ȘI NĂMOL DE EPURARE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)
C.20.	TESTUL DE REPRODUCERE PENTRU *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A AZOTULUI
C.22.	MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A CARBONULUI
C.23.	TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SOL
C.24.	TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SISTEMELE DE SEDIMENTE ACVATICE
C.25.	MINERALIZAREA AEROBĂ ÎN APA DE SUPRAFAȚĂ – TEST DE SIMULARE A BIODEGRADĂRII
C.26.	TEST DE INHIBARE A CREȘTERII LA SPECIILE DE *LEMNA*
C.27.	TEST DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT
C.28.	TESTUL DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU APĂ ÎMBOGĂȚITĂ
C.29.	BIODEGRADABILITATEA RAPIDĂ – CO_2 ÎN VASE ÎNCHISE ERMETIC (TESTARE ÎN SPAȚIUL LIBER)
C.30.	BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE TERESTRE
C.31.	TEST PE PLANTĂ TERESTRĂ: TEST DE APARIȚIE A PLANTULELOR ȘI DE CREȘTERE A PLANTULELOR
C.32.	TEST DE REPRODUCERE A ENCHITREIDELOR
C.33.	TEST DE REPRODUCERE A RÂMELOR (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)
C.34.	DETERMINAREA INHIBĂRII ACTIVITĂȚII BACTERIILOR ANAEROBE – REDUCEREA PRODUCȚIEI DE GAZE PROVENITE DIN NĂMOL (DE EPURARE) SUPUS PROCESULUI DE DIGESTIE ANAEROBĂ
C.35.	TEST DE TOXICITATE PE *LUMBRICULUS* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT
C.36.	TEST DE REPRODUCERE A UNUI ACARIAN PRĂDĂTOR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] DIN SOL
C.37.	TEST DE 21 DE ZILE PE PEȘTI: SCREENING CU DURATĂ SCURTĂ PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII ESTROGENICE ȘI ANDROGENICE ȘI A INHIBĂRII AROMATAZEI
C.38.	TEST DE METAMORFOZĂ LA AMFIBIENI
C.39.	TEST DE REPRODUCERE A COLEMBOLELOR ÎN SOL

▼B

C.40.	TEST DE TOXICITATE PE CHIRONOMIDE CARE CUPRINDE CICLUL DE VIAȚĂ DESFĂȘURAT ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT UTILIZÂND APĂ ADIȚIONATĂ SAU SEDIMENT ADIȚIONAT
C.41.	TEST DE DEZVOLTARE SEXUALĂ A PEȘTILOR
C.42.	BIODEGRADABILITATEA ÎN APĂ DE MARE
C.43.	BIODEGRADABILITATEA ANAEROBĂ A SUBSTANȚELOR ORGANICE DIN NĂMOLUL FERMENTAT: PRIN MĂSURAREA PRODUCERII DE GAZE
C.44..	PERCOLARE ÎN COLOANE DE SOL
C.45.	ESTIMAREA EMISIILOR ÎN MEDIU PROVENITE DE LA LEMNUL TRATAT CU PRODUSE DE CONSERVARE: METODĂ DE LABORATOR PENTRU PRODUSELE DIN LEMN CARE NU SUNT ACOPERITE ȘI CARE SUNT ÎN CONTACT CU APĂ DULCE SAU CU APĂ DE MARE
C.46.	BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE BENTICE CARE TRĂIESC ÎN SEDIMENTE
C.47.	PEȘTI, TEST DE TOXICITATE ÎN STADII TIMPURII DE VIAȚĂ
C.48.	TEST DE REPRODUCERE DE DURATĂ SCURTĂ LA PEȘTI
C.49.	TEST DE TOXICITATE ACUTĂ PE EMBRIONI DE PEȘTE (*FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY* – FET)
C.50.	TEST DE TOXICITATE PE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* FĂRĂ SEDIMENT
C.51.	TEST DE TOXICITATE PE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT
C.52.	STUDIU EXTINS ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA UNEI GENERAȚII PENTRU SPECIA MEDAKA (MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST -MEOGRT)
C.53.	TESTUL PRIVIND CREȘTEREA ȘI DEZVOLTAREA LARVELOR DE AMFIBIENI (LAGDA)

▼B

C.1. TOXICITATEA ACUTĂ LA PEȘTI

1. METODĂ

1.1. INTRODUCERE

Scopul testului de față este de a determina toxicitatea letală acută a unei substanțe la peștii de apă dulce. Este de dorit să se colecteze informații legate de solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, stabilitatea chimică, constantele de disociere și biodegradabilitatea substanței, pentru a alege metoda optimă de testare (statică, semistatică sau dinamică) și pentru a asigura concentrații constante satisfăcătoare ale substanței pe durata testării.

Atât la planificarea testului, cât și la interpretarea rezultatelor se iau în considerare informațiile suplimentare (de exemplu formula structurală, gradul de puritate, natura și procentul de impurități semnificative, prezența și cantitatea de aditivi și coeficientul de partiție n-octanol/apă).

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Toxicitatea acută reprezintă efectul advers vizibil indus într-un organism într-o perioadă scurtă (zile) de expunere la o substanță. În testul de față, toxicitatea acută se exprimă drept concentrația letală mediană (CL_{50}), care este acea concentrație a substanței de testat în apă care provoacă moartea a 50 % din lotul de pești de experiență într-o perioadă de expunere continuă și definită.

Toate concentrațiile substanței de testat se exprimă ca greutate pe volum (miligrame pe litru). Ele pot fi, de asemenea, exprimate ca greutate din greutate (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Se poate testa o substanță de referință pentru a demonstra că în condițiile de testare din laborator răspunsul speciilor testate nu s-a schimbat semnificativ.

Pentru acest test nu sunt specificate substanțe de referință.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se efectuează un test-limită la 100 mg/l pentru a demonstra că CL_{50} este mai mare decât această concentrație.

Peștii se tratează cu substanța de testat solubilizată în apă, într-o serie de concentrații, pe o perioadă de 96 de ore. Se înregistrează mortalitatea la intervale de cel puțin 24 de ore și se calculează concentrațiile care provoacă moartea a 50 % dintre pești (CL_{50}) în fiecare perioadă de observare, dacă este posibil.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Criteriile de calitate se aplică testului-limită, precum și testului complet.

Mortalitatea la martori nu trebuie să depășească 10 % (sau un pește dacă se folosesc mai puțin de zece pești) până la sfârșitul testului.

Concentrația de oxigen dizolvat trebuie să fie mai mare de 60 % din valoarea de saturație în aer, până la sfârșitul testului.

▼B

Concentrațiile substanței de testat se mențin în limita a 80 % din concentrațiile inițiale pe toată durata testului.

Pentru substanțele care se dizolvă ușor în mediul de testare, rezultând soluții stabile, respectiv soluții care nu se volatilizează, degradează, hidrolizează sau adsorb într-o măsură considerabilă, concentrația inițială poate fi considerată echivalentă cu concentrația nominală. Trebuie demonstrat că pe toată durata testului au fost menținute aceleași concentrații, iar criteriile de calitate au fost satisfăcute.

Pentru substanțele care sunt:

(i) puțin solubile în mediul de testare; sau

(ii) capabile să formeze emulsii stabile ori dispersii; sau

(iii) instabile în soluții apoase,

concentrația inițială este considerată drept concentrația determinată analitic în soluție (sau, în cazul în care nu este posibil tehnic, măsurată în coloana de apă) la începutul testului. Concentrația se determină după o perioadă de echilibrare, dar înainte de introducerea peștilor de experiență.

În oricare din aceste cazuri, se efectuează determinări suplimentare pe parcursul testului pentru a confirma concentrațiile reale de expunere sau respectarea criteriilor de calitate.

Valoarea pH-ului trebuie să nu varieze cu mai mult de o unitate.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se pot folosi trei tipuri de metode:

Test în regim static:

Test de toxicitate în care soluția testată nu se înlocuiește (soluțiile rămân nemodificate pe toată durata testului).

Test în regim semistatic:

Test fără înlocuirea continuă a soluției testate, dar cu înlocuirea cu regularitate a întregii soluții (de exemplu la 24 de ore).

Test în regim dinamic:

Test de toxicitate în care soluția testată este reînnoită constant în vasele de testare, substanța de testat fiind transportată cu apa folosită pentru a reînnoi soluția.

1.6.1. **Reactivi**

1.6.1.1. *Soluțiile substanțelor de testat*

Soluțiile mamă în concentrația necesară se prepară prin dizolvarea substanței în apă deionizată sau în apă conform punctului 1.6.1.2.

Concentrațiile de testare alese sunt preparate prin diluarea soluției mamă. Dacă se testează concentrații ridicate, cantitățile corespunzătoare din substanța de testat pot fi solubilizate direct în apa de diluție.

▼B

Substanțele se testează în mod normal numai până la limita solubilității. Pentru unele substanțe (de exemplu: substanțele puțin solubile în apă sau cele cu P_{ow} ridicat sau care formează dispersii stabile în loc de soluții apoase propriu-zise), se acceptă folosirea unei concentrații deasupra limitei de solubilitate a substanței, pentru a garanta concentrația maximă solubilă/stabilă. Cu toate acestea, este important ca această concentrație să nu perturbe sistemul de testare (de exemplu, o peliculă de substanță pe suprafața apei care să împiedice oxigenarea apei etc.).

Pentru a prepara soluțiile mamă ale substanțelor cu solubilitate scăzută în apă sau pentru a facilita dispersia acestor substanțe în mediul de testare se pot folosi dispersia cu ultrasunete, solvenți organici, agenți de emulsionare sau agenți de dispersie. În cazul în care se folosesc astfel de substanțe auxiliare, toate concentrațiile trebuie să conțină aceeași cantitate de substanță auxiliară, iar peștii martor sunt tratați cu aceeași concentrație a substanței auxiliare ca și cea folosită în loturile tratate. Concentrația unor astfel de substanțe auxiliare trebuie redusă la minimum și în niciun caz nu trebuie să depășească 100 mg/l.

Testul se efectuează fără reglarea pH-ului. Dacă există dovada unei schimbări pronunțate a pH-ului, se recomandă ca testul să se repete după reglarea pH-ului, iar rezultatele să se consemneze. În acest caz, valoarea pH-ului soluției mamă se reglează la valoarea pH-ului apei de diluție, dacă nu există contraargumente specifice. Pentru reglarea pH-ului sunt preferate HCl și NaOH. Această reglare a pH-ului se face astfel încât concentrația substanței de testat din soluția mamă să nu se modifice în mod semnificativ. Dacă în urma acestei corecții de pH are loc o reacție chimică sau precipitarea fizică a substanței de testat, acest lucru trebuie consemnat.

1.6.1.2. *Apa de întreținere și de diluție*

Se poate folosi apa potabilă (necontaminată de concentrații potențial dăunătoare de clor, metale grele sau alte substanțe), apa naturală de calitate bună sau apa reconstituită (a se vedea apendicele 1). Se preferă apa cu o duritate totală între 10 și 250 mg/l ($CaCO_3$) și cu un pH cuprins în intervalul 6,0-8,5.

1.6.2. **Aparatură**

Toată aparatura este confecționată din material inert din punct de vedere chimic.

— sistem automat de diluare (pentru testare în condiții dinamice);

— oxigenometru;

— echipament pentru determinarea durității apei;

— aparatură adecvată pentru controlul temperaturii;

— pH-metru.

1.6.3. **Pești de experiență**

Peștii trebuie să fie sănătoși și fără malformații vizibile.

▼B

Speciile folosite sunt selectate pe baza unor criterii practice cum sunt: disponibilitatea lor tot timpul anului, întreținere ușoară, testare convenabilă, sensibilitatea relativă la substanțe chimice și orice factor economic și biologic sau ecologic important. La selectarea speciilor de pești se va ține seama de necesitatea comparabilității datelor obținute și de armonizarea internațională existentă (referința bibliografică 1).

Lista speciilor de pești recomandate pentru efectuarea acestui test este prezentată în apendicele 2; peștele zebră și păstrăvul curcubeu sunt speciile preferate.

1.6.3.1. *Întreținere*

Peștii supuși testului trebuie, de preferință, să provină dintr-un singur lot ai cărui indivizi au lungimea și vârsta asemănătoare. Sunt ținuți timp de cel puțin 12 zile în condițiile următoare:

încărcătură:

adecvată sistemului folosit (recirculare sau în regim dinamic) și de specia de pești;

apă:

a se vedea punctul 1.6.1.2;

lumină:

iluminare 12-16 ore pe zi;

concentrația de oxigen dizolvat:

cel puțin 80 % din valoarea de saturație în aer;

alimentație:

zilnic sau de 3 ori pe săptămână, cu o pauză de 24 de ore înaintea începerii testului.

1.6.3.2. *Mortalitate*

După o perioadă de 48 de ore de adaptare, se înregistrează mortalitatea și se aplică următoarele criterii:

— mai mare de 10 % din populație în 7 zile:

respingerea întregului lot;

— între 5 și 10 % din populație:

perioada de întreținere continuă încă 7 zile.

Dacă nu mai apare mortalitate, lotul este acceptat, în caz contrar este respins;

— sub 5 % din populație:

acceptarea lotului.

1.6.4. **Adaptare**

Toți peștii trebuie să fie ținuți în apă de calitatea și temperatura care urmează să fie folosite la test, timp de cel puțin 7 zile înainte de a fi folosiți.

▼B

1.6.5. **Procedura de testare**

Testul principal poate fi precedat de un test de stabilire a intervalului, pentru a obține informații legate de intervalul de concentrații ce urmează să fie folosite.

Pe lângă testarea propriu-zisă, se efectuează un test martor fără substanță de testat și, dacă are semnificație, încă un test martor pentru substanța auxiliară.

În funcție de proprietățile fizice și chimice ale substanței de testat, se alege metoda adecvată statică, semistatică sau dinamică, pentru a îndeplini criteriile de calitate.

Peștii sunt expuși substanței conform celor descrise mai jos:

— durata: 96 ore;

— numărul de organisme testate: cel puțin 7 pe concentrație;

— vase: de capacitate adecvată în funcție de greutatea recomandată a lotului;

— greutatea lotului testat: se recomandă greutatea maximă de 1 g/l pentru testele în regim static și semistatic; pentru testele în regim dinamic se acceptă o greutate mai mare;

— concentrația testată: cel puțin 5 concentrații spațiate printr-un factor constant care nu depășește 2,2 și, dacă este posibil, într-un interval de 0-100 % mortalitate;

— apă: a se vedea punctul 1.6.1.2;

— lumină: 12-16 ore lumină zilnic;

— temperatură: conform speciei (apendicele 2) dar în limita ± 1 °C în cadrul fiecărei testări;

— concentrația de oxigen dizolvat: nu mai puțin de 60 % din valoarea de saturație în aer la temperatura selectată;

— hrănire: nu se administrează hrană.

Peștii sunt observați după primele 2-4 ore și la intervale de cel puțin 24 de ore. Peștii se consideră morți dacă atingerea pedunculului caudal nu produce nicio reacție și nu sunt vizibile mișcări de respirație. Peștii morți se îndepărtează în momentul în care sunt observați și se înregistrează mortalitatea. Se ține evidența comportamentului anormal vizibil (de exemplu, pierderea echilibrului, perturbări de înot, funcția respiratorie, pigmentare etc.).

Trebuie să se efectueze zilnic măsurători ale pH-ului, oxigenului dizolvat și temperaturii.

Test-limită

Folosind modul de operare descris în prezenta metodă de testare, se poate efectua un test-limită la 100 mg/l pentru a demonstra că CL_{50} este mai mare decât această concentrație.

Dacă natura substanței nu permite atingerea concentrației de 100 mg/l în soluția de testare, testul-limită se efectuează la o concentrație egală cu solubilitatea substanței (sau concentrația maximă pentru formarea unei dispersii stabile) în mediul folosit (a se vedea și punctul 1.6.1.1).

▼B

Testul-limită se efectuează folosind între 7 și 10 pești, cu același număr de teste martor. (Conform teoriei binomului, dacă se folosesc 10 pești și mortalitatea este 0, există 99,99 % încredere că CL_{50} este mai mare decât concentrația folosită în testul-limită. Cu 7, 8 sau 9 pești, absența mortalității asigură cel puțin 99 % încredere că CL_{50} este mai mare decât concentrația folosită).

Dacă apare mortalitate, trebuie să se efectueze un studiu complet. Dacă se observă efecte subletale, acestea se înregistrează.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

Pentru fiecare perioadă în care s-au înregistrat observații (24, 48, 72 și 96 de ore) se reprezintă grafic mortalitatea exprimată în procente, în funcție de concentrație, pe o hârtie probit logaritmică.

Dacă este posibil, pentru fiecare perioadă de observare se estimează CL_{50} și limitele de încredere ($p = 0,05$) prin metode standard; aceste valori se rotunjesc la una sau cel mult două cifre semnificative (exemple de rotunjire la două cifre: 170 pentru 173,5; 0,13 pentru 0,127; 1,2 pentru 1,21).

În cazul în care panta curbei de răspuns concentrație/procentaj este prea abruptă pentru a permite calcularea valorii CL_{50}, este suficientă estimarea grafică a acestei valori.

În cazul în care două concentrații consecutive aflate în raport de 2,2 dau numai 0 și 100 % mortalitate, aceste două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se situează CL_{50}.

Dacă se observă că stabilitatea sau omogenitatea substanței de testat nu poate fi menținută, acest lucru se consemnează, iar rezultatele trebuie interpretate cu atenție.

3. **RAPORT**

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele informații:

— informații despre peștii de experiență (denumirea științifică, linia, furnizorul, orice tratament preliminar, dimensiunea și numărul folosit pentru fiecare concentrație testată);

— sursa apei de diluție și caracteristicile chimice principale (pH, duritate, temperatură);

— în cazul unei substanțe puțin solubile în apă, metoda de preparare a soluției mamă și a soluțiilor de testare;

— concentrația eventualelor substanțe auxiliare;

— lista concentrațiilor folosite și orice informații disponibile legate de stabilitatea substanțelor chimice la concentrațiile din soluția de testare;

— dacă se efectuează analize chimice, metodele folosite și rezultatele obținute;

— rezultatele testului-limită, după caz;

— motivele alegerii metodei de testare folosite și detalii cu privire la aceasta (de exemplu: statică, semistatică, raportul dozelor, viteza curgerii, condițiile de aerare, greutatea lotului de pești testat etc.);

▼B

— descrierea echipamentului de testare;

— regimul de iluminare;

— concentrațiile de oxigen dizolvat, valorile pH-ului și temperaturile soluțiilor testate la fiecare 24 de ore;

— dovada îndeplinirii criteriilor de calitate;

— tabelul care prezintă mortalitatea cumulată pentru fiecare concentrație testată și înregistrările aferente controlului (inclusiv pentru testul martor cu substanță auxiliară, după caz) la fiecare perioadă de observație recomandată;

— graficul curbei de răspuns concentrație/procentaj la sfârșitul testării;

— dacă e posibil, valorile CL_{50} la fiecare perioadă de observație recomandată (cu limite de încredere de 95 %);

— metodele statistice folosite pentru determinarea valorilor CL_{50};

— dacă s-a folosit o substanță de referință, rezultatele obținute;

— concentrația testată maximă care nu provoacă mortalitate pe durata testării;

— concentrația testată minimă care provoacă mortalitate 100 % pe durata testării.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

3. AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.

4. ISO 7346/1,/2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5. Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10. Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

11. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12. Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, p. 99.

16. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, p. 793-821.

18. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, p. 3-32.

19. Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, p. 65-84.

20. Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Apendicele 1

Apă reconstituită

Exemplu de apă de diluție adecvată

Toate substanțele chimice sunt de puritate analitică.

Apa este apă distilată și de calitate bună sau apă deionizată cu o conductibilitate mai mică de 5 μScm^{-1}.

Aparatura pentru distilarea apei trebuie să nu conțină nicio piesă din cupru.

Soluțiile mamă

$CaCl_2$. 2H2O (clorură de calciu dihidrat): 11,76 g
Dizolvată și completată până la 1 litru cu apă.

$MgSO_4$. 7H2O (sulfat de magneziu heptahidrat): 4,93 g
Dizolvat și completat până la 1 litru cu apă.

$NaHCO_3$ (carbonat acid de sodiu): 2,59 g
Dizolvat și completat până la 1 litru cu apă.

KCl (clorură de potasiu): 0,23 g
Dizolvată și completată până la 1 litru cu apă.

Apă de diluție reconstituită

Se adaugă câte 25 ml din cele patru soluții mamă și se completează până la 1 litru cu apă.

Se aerează până când concentrația oxigenului dizolvat este egală cu valoarea de saturație în aer.

PH-ul este 7,8 ± 0,2.

Dacă este necesar, pH-ul se reglează cu NaOH (hidroxid de sodiu) sau HCl (acid clorhidric).

Apa de diluție astfel preparată este lăsată în repaos aproximativ 12 ore și nu mai este aerată.

Suma ionilor de Ca și Mg în această soluție este 2,5 mmol/l. Raportul ionilor Ca:Mg este 4:1, iar cel al ionilor Na:K este 10:1. Alcalinitatea totală a acestei soluții este 0,8 mmol/l.

Orice abatere în prepararea apei de diluție nu trebuie să schimbe compoziția sau proprietățile apei.

▼B

Apendicele 2

Speciile de pești recomandate pentru testare

Speciile recomandate	Intervalul de temperatură recomandat pentru testare (°C)	Lungimea totală recomandată a animalului de experiență (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Peștele zebră	20-24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Boiștean	20-24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Crap comun	20-24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850)	20-24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20-24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758)	20-24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Păstrăv curcubeu	12-17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Văduviță	20-24	6,0 ± 2,0

Aprovizionare

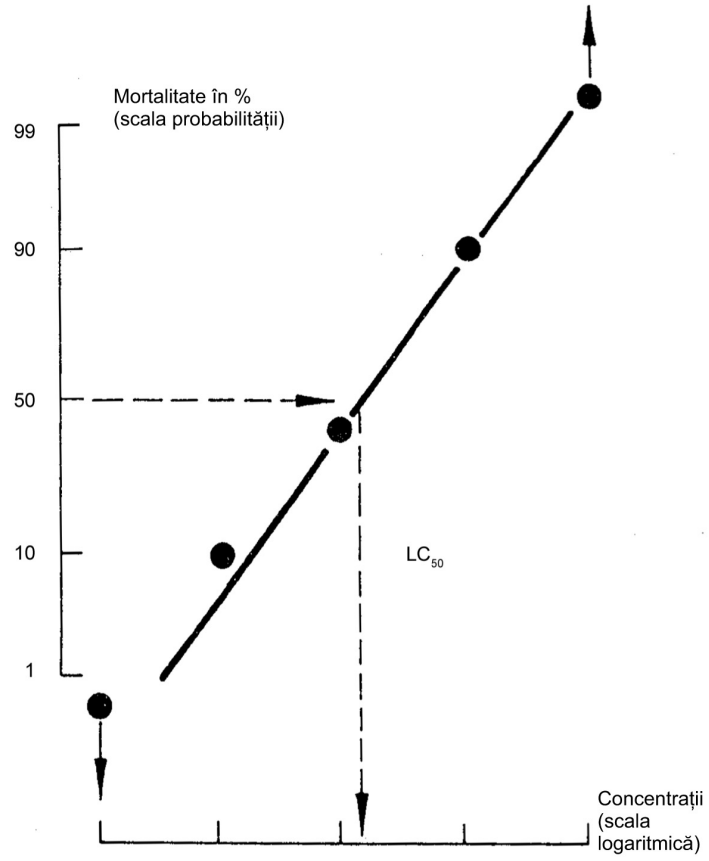
Peștii din lista de mai sus sunt ușor de crescut și/sau se găsesc din abundență în tot timpul anului. Pot fi crescuți și înmulțiți în crescătoriile de pești sau în laborator, în condiții controlate de boală și paraziți astfel încât animalele testate să fie sănătoase și cu ascendență cunoscută. Acești pești sunt disponibili în multe locuri ale lumii.

▼B

Apendicele 3

Exemplu de înregistrare grafică: concentrație/procentul de mortalitate

Exemplu de determinare a CL_{50} cu hârtie probit logaritmică



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP. TESTUL IMOBILIZĂRII ACUTE

1. METODĂ

Această metodă de testare a imobilizării acute este echivalentă cu Orientarea 202 (2004) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă descrie un test de toxicitate acută care are rolul de a evalua efectele substanțelor chimice asupra dafniilor. Utilizarea măsurilor de testare existente s-a făcut în limita posibilului (1) (2) (3).

1.2. DEFINIȚII

În contextul utilizării acestei metode s-au folosit următoarele definiții:

CE_{50}: concentrația estimată capabilă să imobilizeze 50 % din dafnii în cadrul unei perioade de expunere determinate. În cazul în care se utilizează o altă definiție, aceasta trebuie raportată împreună cu referința.

Imobilizare: animalele incapabile să înoate în intervalul de 15 secunde după agitarea ușoară a recipientului de testare sunt considerate ca fiind imobilizate (chiar dacă își pot mișca încă antenele).

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Dafniile tinere, cu vârsta mai mică de 24 ore în momentul începerii testului, sunt expuse timp de 48 de ore la diferite concentrații ale substanței de testare. Imobilizarea este înregistrată la 24 și la 48 de ore și comparată cu valorile de control. Se analizează rezultatele în scopul calculării CE_{50} la 48 de ore (a se vedea punctul 1.2 pentru definiții). Determinarea CE_{50} la 24 de ore este opțională.

1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

Se recomandă cunoașterea solubilității în apă și a presiunii vaporilor substanței de testare și existența unei metode analitice fiabile pentru dozarea substanței în soluțiile de testare, ale cărei eficiență de recuperare și limită de determinare sunt cunoscute. Informațiile utile includ formula structurală, gradul de puritate al substanței, stabilitatea în apă sau la lumină, coeficientul de partiție octanol/apă – log P_{ow} și rezultatele unui test privind biodegrabilitatea imediată (a se vedea metoda C.4).

Notă: Referința 4 furnizează recomandări în ceea ce privește substanțele de testare cu proprietățile fizice și chimice care fac dificilă testarea acestora.

1.5. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

O substanță de referință poate fi testată pentru determinarea CE_{50} ca o metodă de siguranță în sensul fiabilității condițiilor de testare. Se recomandă în acest scop substanțe toxice utilizate în testele circulare internaționale (1) (5) ([1]). Se recomandă ca testele cu o substanță de referință să se realizeze de preferință în fiecare lună și cel puțin de două ori pe an.

([1]) Rezultatele acestor teste între laboratoare, precum și un corringedum tehnic la ISO 6341 oferă un CE_{50} la 24 h al dicromatului de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) cuprins în intervalul 0,6-1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITERII DE CALITATE

Pentru ca testul să fie valid, se aplică următoarele criterii de performanță:

— în cadrul grupurilor de control, inclusiv grupul de control care conține agent de solubilizare, se recomandă a fi imobilizate cel mult 10 % dintre dafnii;

— concentrația de oxigen dizolvată la sfârșitul testului ar trebui să fie ≥ 3 mg/l în recipientele de control și testare.

Notă: Pentru primul criteriu, cel mult 10 % dintre dafniile din grupul de control trebuie să fie imobilizate sau să prezinte alte semne de maladie sau de stress, precum decolorare sau comportament neobișnuit (de exemplu, rămân prinse la suprafața apei).

1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.7.1. **Aparatură**

Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu soluțiile de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic. În mod normal recipientele de testare sunt eprubete sau pahare de laborator. Se recomandă curățarea acestora înainte de fiecare utilizare prin metodele standard de laborator. Se recomandă ca recipientele de testare să fie acoperite pentru a reduce pierderea de apă prin evaporare, precum și pentru a se evita pătrunderea de praf în soluții. Se recomandă ca substanțele volatile să fie testate în recipiente umplute complet și închise, suficient de mari astfel încât concentrația de oxigen să nu fie prea slabă sau limitată (a se vedea punctul 1.6 și primul alineat al punctului 1.8.3).

În plus, se vor folosi unul sau toate echipamentele următoare: un aparat pentru măsurarea concentrației de oxigen (cu microelectrod sau un alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în mostre de volum mic); un aparat pentru măsurarea pH-ului; aparatură adecvată pentru controlul temperaturii; echipament pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT); echipament pentru determinarea necesarului de oxigen chimic (NOC); echipament pentru determinarea durității etc.

1.7.2. **Organism de testare**

Specia preferată pentru testare este *Daphnia magna* Straus, deși se pot folosi pentru acest test și alte specii de *Daphnia* adecvate (de exemplu, *Daphnia pulex*). La începutul testului, animalele trebuie să aibă vârsta mai mică de 24 de ore, iar pentru reducerea variabilității, se recomandă ca acestea să nu provină din prima generație de descendenți. Se recomandă să provină dintr-un lot sănătos (să nu prezinte semne de stres cum ar fi mortalitatea ridicată, prezența masculilor și ephippia, întârzieri în producerea primei progenituri, animale decolorate etc.). Se recomandă ca toate organismele utilizate pentru un anumit test să provină din culturi înființate din același lot de dafnii. Lotul respectiv trebuie să fie menținut în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu) similare cu cele utilizate în timpul testului. Dacă mediul de cultură al dafniilor care vor fi utilizate în timpul testului diferă de cel utilizat în mod normal pentru o cultură de dafnii, este bine să se includă o perioadă de aclimatizare înainte de test. De aceea, se recomandă ca dafniile provenite din aceeași cultură să fie menținute în apă de diluare la temperatura de testare timp de aproximativ 48 ore înainte de începerea testului.

▼B

1.7.3. **Apa de păstrare și diluare**

Sunt acceptate ca lichid de păstrare și de diluare apele naturale (de suprafață și subterane), lichid reconstituit sau apă de la robinet declorurată dacă dafniile vor supraviețui în acesta pe durata culturii, aclimatizării și testării fără a prezenta semne de stres. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil așa cum este prezentat în apendicele 1 este potrivit ca apă pentru testare. Este bine ca aceasta să aibă o calitate constantă de-a lungul perioadei de testare. Apa reconstituită poate fi obținută prin adăugarea, la apa deionizată sau distilată, a unei cantități specifice de reactivi având o gradare analitică recunoscută. Referințele 1, 6 și apendicele 2 oferă exemple de apă reconstituită. A se observa că mediile care conțin agenți de chelare cunoscuți, cum ar fi mediile M4 și M7 din apendicele 2, trebuie evitate la testarea substanțelor care conțin metale. Se recomandă un pH într-o gamă de la 6 la 9. Pentru *Daphnia Magna* se recomandă o duritate cuprinsă între 140 și 250 mg/l (cum ar fi $CaCO_3$), în timp ce un grad mai scăzut de duritate poate fi adecvat pentru alte specii de *Daphnia*. Apa pentru diluare poate fi aerată înainte de a fi utilizată pentru test astfel încât concentrația de oxigen dizolvat să fi atins gradul de saturație.

Dacă se utilizează apă naturală, se recomandă ca parametrii de calitate să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că aceste caracteristici este posibil să se fi schimbat semnificativ (a se vedea alineatul anterior și apendicele 1). De asemenea, se recomandă realizarea măsurătorilor concentrației de metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Dacă se utilizează apă de robinet declorurată, este de dorit să se realizeze o analiză zilnică a conținutului de cloruri. Dacă apa de diluare provine de la o apă de suprafață sau subterană, se recomandă măsurarea necesarului de conductivitate și carbon organic total (COT) sau de oxigen chimic.

1.7.4. **Soluții de testare**

Soluțiile de testare cu concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții din stoc. Este preferabil ca soluțiile din stoc să se prepare prin dizolvarea substanței de testare în apa de diluare. Pe cât posibil, se recomandă evitarea solvenților, a emulsifianților sau a dispersanților. Totuși, astfel de componente pot fi necesare în anumite situații pentru a se produce o soluție de stoc cu o concentrație corespunzătoare. Recomandări privind solvenții, emulsifianții și dispersanții adecvați se regăsesc la referința 4. În orice caz, se recomandă ca substanțele de testare din soluțiile de testare să nu depășească limita solubilității în apa de diluare.

Se recomandă ca testul să se desfășoare fără a se regla pH-ul. Dacă pH-ul nu rămâne în interiorul gamei 6-9, atunci se poate realiza un al doilea test, reglând pH-ul soluției de stoc la acela al apei de diluare înainte de adăugarea substanței de testare. Se recomandă ca reglarea pH-ului să se facă astfel încât concentrația soluției de stoc să nu fie schimbată semnificativ și astfel încât să nu se producă nicio reacție chimică sau precipitare a substanței de testare. Se preferă HCl și NaOH.

▼B

1.8. PROCEDURĂ

1.8.1. **Condiții de expunere**

1.8.1.1. *Grupuri de testare și control*

Vasele pentru testare se umplu cu volume corespunzătoare de apă diluată și soluții de substanțe de testare. Se recomandă ca proporția aer/volum de apă din vas să fie identică pentru grupurile de testare și control. Se plasează apoi dafniile în vasele de testare. Se recomandă a se utiliza cel puțin 20 de animale, împărțite în patru grupuri de câte cinci animale fiecare, la fiecare concentrație a testului și pentru controale. Se vor furniza cel puțin 20 ml de soluție pentru fiecare animal (respectiv o cantitate de 10 ml pentru cinci dafnii pe fiecare vas de testare). Atunci când concentrația substanței de testare nu este stabilă, testul se poate desfășura utilizând un sistem de reînnoire semi-statică sau continuă.

În plus față de seria pentru tratament, trebuie desfășurate o serie de control a apei de diluare și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de control conținând agent de solubilizare.

1.8.1.2. *Concentrațiile pentru testare*

Se poate desfășura un test pentru definirea gamei de concentrații de utilizat la testarea definitivă cu condiția să existe informații privind toxicitatea substanței de test. În acest scop, dafniile sunt expuse unei serii de concentrații a substanței de testare întinsă pe un interval larg. Se vor expune un număr de cinci dafnii la fiecare concentrație de testare timp de 48 ore sau mai puțin, și nu este necesară repetarea. Perioada de expunere poate fi scurtată (de exemplu, 24 ore sau mai puțin) dacă datele necesare desfășurării testului de definire a gamei pot fi obținute în mai puțin timp.

Se recomandă a se utiliza cel puțin cinci concentrații de testare. Se recomandă aranjarea acestora într-o serie geometrică având un factor de separare care este preferabil să nu depășească 2.2. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se vor aduce argumente pentru aceasta. Este de preferat ca cea mai înaltă concentrație testată să conducă la o imobilizare de 100 %, iar cea mai joasă concentrație testată este preferabil să nu producă efecte observabile.

1.8.1.3. *Condiții de incubare*

Este recomandat ca temperatura să se situeze în intervalul 18-22 ^{o}C, iar în cazul unei singure testări, este bine ca aceasta să rămână constantă în limita ± 1 ^{o}C. Se recomandă un ciclu de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric. Se acceptă și întuneric deplin, în special pentru substanțele de testare care prezintă instabilitate la lumină.

Este interzis ca vasele să fie aerate pe perioada testării. Testul se desfășoară fără reglarea pH-ului. Se recomandă ca dafniile să nu fie hrănite pe perioada testului.

1.8.1.4. *Durată*

Durata testului este de 48 ore.

1.8.2. **Observații**

La fiecare 24 ore și 48 ore după începerea testării, fiecare vas de testare va fi verificat pentru depistarea dafniilor imobilizate (a se vedea punctul 1.2 pentru definiții). În plus față de imobilitate, se va raporta orice reacție sau imagine anormală.

▼B

1.8.3. **Măsurători analitice**

Se măsoară oxigenul dizolvat și pH-ul la începutul și la sfârșitul testării și concentrația cea mai înaltă a substanței de testare și de control. Se recomandă o concentrație a oxigenului dizolvat care să fie în concordanță cu criteriile de validitate (a se vedea punctul 1.6). În mod normal concentrația pH-ului nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în cadrul oricărui test. De obicei se măsoară temperatura în vasele de control sau în aerul ambiental și se recomandă ca aceasta să fie înregistrată, de preferință, în mod continuu pe perioada testului sau, ca cerință minimă, la începutul și la sfârșitul testării.

Se recomandă măsurarea concentrației substanței de testare cel puțin la valoarea maximă și la valoarea minimă, la începutul și la sfârșitul testării (4). Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Totuși, dacă există probe care să demonstreze că s-a menținut concentrația substanței de testare în mod corespunzător în intervalul ± 20 % față de concentrația nominală sau măsurată inițial, pe tot parcursul perioadei de testare, atunci rezultatele pot fi calculate pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial.

1.9. TEST-LIMITĂ

Utilizând procedurile descrise în prezenta metodă, se poate efectua un test-limită la 100 mg/l de substanță de testare sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare (oricare dintre acestea este mai scăzută) pentru a demonstra că CE_{50} este mai mare decât această concentrație. Se recomandă efectuarea testului-limită prin utilizarea a 20 de dafnii (împărțite preferabil în patru grupuri de câte cinci), cu același număr de animale grupurile de control. Dacă imobilizarea se manifestă, se va realiza un studiu complet. Se va înregistra orice reacție anormală detectată.

2. **DATE**

Datele sunt sintetizate sub formă de tabel, indicând, pentru fiecare grup de tratament și control, numărul de dafnii utilizat, imobilizarea la fiecare observare. Procentele imobilizate la 24 și 48 de ore se vor pondera față de concentrațiile de testare. Datele se analizează cu mijloace statistice adecvate (de exemplu analiză de probitate etc.) pentru a se calcula pantele curbelor și CE_{50} în limite de fiabilitate de 95 % (p = 0,05) (7) (8).

În situațiile în care metodele standard de calculare a CE_{50} nu sunt aplicabile pentru datele obținute, se recomandă utilizarea celei mai mari concentrații care nu produce imobilitate și a celei mai scăzute concentrații care produce imobilitate 100 % ca metodă de aproximare a CE_{50} (aceasta devenind media geometrică a acestor două concentrații).

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare va include următoarele:

Substanța de testare:

— stare fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

▼B

— date de identificare de natură chimică, inclusiv puritatea.

Specia folosită pentru testare:

— sursa și speciile de *Daphnia,* originea sursei (dacă este cunoscută) și condițiile de cultură utilizate (inclusiv origine, tip și cantitate de hrană, frecvența hrănirii).

Condiții de testare:

— descrierea vaselor de testare: tipul de vase, volumul soluției, numărul de dafnii pe vas de testare, numărul de vase de testare (replicate) pe concentrație;

— metode de preparare a stocului și a soluțiilor de testare, inclusiv utilizarea oricărui solvent sau dispersant, concentrațiile utilizate;

— detalii privind apa utilizată pentru diluare: caracteristicile sursei și calității apei (pH, duritate; proporția Ca/Mg; proporția Na/K; alcalinitate, conductivitate etc.); compoziția apei reconstituite dacă aceasta a fost utilizată;

— condiții de incubare: temperatură, intensitatea și frecvența luminii; cantitatea de oxigen dizolvat, pH etc.

Rezultate:

— numărul și procentajul de dafnii care au fost imobilizate sau care au prezentat efecte negative (inclusiv reacții anormale) în grupurile de control și în fiecare grup de tratare, la fiecare interval de observare și o descriere a naturii efectelor observate;

— rezultatele și datele testului efectuat cu substanțe de referință, dacă sunt disponibile;

— valorile nominale ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru a determina concentrația substanței de testare în vasele de testare; de asemenea, se vor raporta eficiența de recuperare a metodei și limita de determinare;

— toate măsurătorile fizico-chimice ale temperaturii, pH-ului și oxigenului dizolvat de-a lungul perioadei de testare;

— CE_{50} la 48 de ore referitor la imobilizare cu limite de fiabilitate și grafice ale modelului adecvat utilizat pentru calcul, pantele curbelor de răspuns la dozaj și eroarea standard; procedurile statistice utilizate pentru determinarea CE_{50}; (aceste informații referitoare la imobilizare la 24 de ore se vor raporta la momentul la care au fost măsurate);

— explicații privind orice abatere de la metoda de testare și dacă abaterea a afectat rezultatele testului.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* sp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials, p. 65-84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

APENDICELE 1

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUARE DE NIVEL ACCEPTABIL

Substanță	Concentrație
Particule	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clorură reziduală	< 10 µg/l
Cantitate totală de pesticide organofosforoase	< 50 ng/l
Cantitate totală de pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	< 50 ng/l
Cantitate totală de clorură organică	< 25 ng/l

▼B

APENDICELE 2

EXEMPLE DE APĂ DE TESTARE RECONSTITUITĂ ACCEPTABILĂ

ISO Apă de testare (1)

Soluție de stoc (o singură substanță)		Pentru prepararea apei reconstituite, se adaugă următoarele volume de soluții din stoc la 1 l de apă (*)
Substanță	Cantitate adăugată la 1 l de apă (*)	
Clorură de calciu $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfat de magneziu $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonat de sodiu $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Clorură de potasiu KCl	0,23 g	25 ml

(*) Apă cu un grad de puritate adecvat, de exemplu deionizată, distilată sau obținută prin osmoză inversă, cu o conductivitate de preferință inferioară valorii de 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Medii Elendt M4 și M7

Aclimatizare la mediile Elendt M4 și M7

Anumite laboratoare au întâmpinat dificultăți în a transfera direct Daphnia în mediile M4 și M7. Totuși, au fost obținute anumite succese printr-o aclimatizate graduală, respectiv prin mutarea din propriul mediu la 30 % Elendt, apoi la 60 % Elendt și apoi la 100 % Elendt. Este posibil ca perioada de aclimatizare să ajungă până la o lună.

Pregătire

Element de urmărire

Soluțiile de stoc separate (I), conținând elemente individuale de urmărire se prepară mai întâi în apă cu o puritate adecvată, de exemplu, deionizată, distilată sau obținută prin osmoză inversă. Din aceste soluții de stoc diferite (I) se prepară o singură soluție de stoc (II), care conține toate elementele de urmărire (soluție combinată), de exemplu:

Soluție (soluții) de stoc I (o singură substanță)	Cantitate adăugată la apă (mg/l)	Concentrație (în raport cu mediul M4)	Pentru prepararea soluției combinate de stoc II, se adaugă următoarele volume de soluții de stoc I la cantitatea de apă (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000 de ori	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 de ori	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 de ori	1,0	0,25

▼B

Soluție (soluții) de stoc I (o singură substanță)	Cantitate adăugată la apă (mg/l)	Concentrație (în raport cu mediul M4)	Pentru prepararea soluției combinate de stoc II, se adaugă următoarele volume de soluții de stoc I la cantitatea de apă (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 de ori	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 de ori	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 de ori	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 de ori	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 de ori	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 de ori	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 de ori	1,0	1,0
KI	65	20 000 de ori	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000 de ori	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000 de ori	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000 de ori	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 de ori	—	—

Ambele soluții, Na 2 EDTA și $FeSO_4$, se prepară independent, se toarnă împreună și se autoclavează imediat.

Aceasta conduce la:

Soluție 2 l Fe-EDTA		1 000 de ori	20,0	5,0

Mediile M4 și M7

Mediile M4 și M7 se prepară utilizând soluția de stoc II, macro-nutrienți și vitamine după cum urmează:

	Cantitate adăugată la apă (mg/l)	Concentrație (în raport cu mediul M4)	Cantitate de soluție de stoc II adăugată pentru a prepara mediul (ml/l)	
			M4	M7
Soluție de stoc II (elemente de urmărire combinate)		20 de ori	50	50
Soluții complexe pe bază de macro nutrienți (substanță singulară)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 de ori	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 de ori	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 de ori	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 de ori	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000 de ori	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 de ori	0,1	0,1

▼B

	Cantitate adăugată la apă (mg/l)	Concentrație (în raport cu mediul M4)	Cantitate de soluție de stoc II adăugată pentru a prepara mediul (ml/l)	
			M4	M7
Soluție de stoc de vitamine combinate	—	10 000 de ori	0,1	0,1
Soluția de stoc pe bază de vitamine combinate se prepară prin adăugarea a 3 vitamine la 1 l de apă, după cum se indică mai jos:				
Clorhidrat de tiamină	750	10 000 de ori		
Cianocobalamin (B_{12})	10	10 000 de ori		
Biotină	7,5	10 000 de ori		

Soluția pe bază de vitamine combinate se păstrează congelată în alicoturi. Vitaminele se adaugă în medii imediat înainte de utilizare.

NB: Pentru a evita precipitarea sărurilor atunci când se pregătesc mediile finale, se adaugă conținutul din alicoturi de substanță de stoc la o cantitate de aproximativ 500-800 ml de apă deionizată și apoi se umple până la 1 l.

NB: Prima publicație referitoare la mediul M4 se găsește în Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, p. 25-33.

▼M6

C.3. ALGE DE APĂ DULCE ȘI CIANOBACTERII, TEST DE INHIBARE A CREȘTERII

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 201 (2006, anexă corectată în 2011). A fost identificată nevoia extinderii metodei de testare pentru a include specii suplimentare și a actualizării acesteia pentru a îndeplini cerințele privind evaluarea pericolelor și clasificarea substanțelor chimice. Această revizuire a fost efectuată pe baza unei experiențe practice vaste, a progresului științific în domeniul studierii toxicității algelor și a utilizării largi în domeniul reglementării care s-au înregistrat după adoptarea inițială.

2. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Scopul acestui test constă în determinarea efectelor unei substanțe chimice asupra creșterii microalgelor de apă dulce și/sau a cianobacteriilor. Organismele de testare cu o creștere exponențială se expun substanței chimice de testare sub formă de loturi de cultură în general pentru o perioadă de 72 de ore. În pofida duratei relativ scurte a testului, se pot evalua efectele asupra câtorva generații.

4. Sistemul răspunde prin reducerea creșterii la o serie de culturi de alge (unități de testare) expuse la diferite concentrații ale unei substanțe chimice de testare. Răspunsul se evaluează ca funcție a concentrației de expunere în comparație cu creșterea medie a culturilor de control duplicate și neexpuse. Pentru exprimarea completă a răspunsului sistemului la efecte toxice (sensibilitate optimă), culturilor le este permisă o creștere exponențială nerestricționată în condiții de hrănire suficientă și lumină continuă, pentru o perioadă de timp suficientă pentru măsurarea reducerii vitezei specifice de creștere.

5. Creșterea și inhibarea creșterii sunt cuantificate prin măsurări ale biomasei de alge în funcție de timp. Biomasa de alge se definește ca greutate uscată per volum, de exemplu mg alge/litru soluție de testare. Totuși, greutatea uscată este dificil de măsurat și, prin urmare, se folosesc parametri înlocuitori. Dintre acești înlocuitori, numărul celulelor este cel mai des folosit. Alți parametri înlocuitori sunt volumul celulelor, fluorescența, densitatea optică etc. Este necesară cunoașterea unui factor de conversie între parametrul înlocuitor măsurat și biomasă.

6. Punctul final de testare este inhibarea creșterii, exprimată ca creștere logaritmică a biomasei (viteza medie specifică de creștere) în timpul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a vitezei de creștere specificată de x % (de exemplu 50 %) se determină din vitezele medii specifice de creștere înregistrate pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca E_rC_x (de exemplu E_rC_{50}).

7. O variabilă de răspuns suplimentară folosită în această metodă de testare este randamentul, care poate fi necesar pentru îndeplinirea unor cerințe de reglementare specifice din unele țări. Acesta se definește ca biomasa de la sfârșitul perioadei de expunere minus biomasa de la începutul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a randamentului specificată de x % (de exemplu 50 %) se calculează din randamentul înregistrat pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca E_yC_x (de exemplu E_yC_{50}).

8. În plus, concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina prin metode statistice.

▼**M6**

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

9. Informațiile referitoare la substanța chimică de testare, care pot fi utile pentru stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile de testare, proprietățile de absorbție a luminii, pK_a și rezultatele studiilor de transformare, inclusiv biodegradabilitatea în apă.

10. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă, coeficientul de partiție octanol/apă (P_{ow}) și presiunea de vapori a substanței chimice de testare și să fie disponibilă o metodă validată de determinare cantitativă a substanței chimice în soluțiile de testare, cu eficiență a recuperării și limită de detecție cunoscute.

VALIDITATEA TESTULUI

11. Pentru ca testul să fie valabil, trebuie să se îndeplinească următoarele criterii de performanță:

— Biomasa din culturile de control trebuie să fi crescut exponențial cu un factor de cel puțin 16 pe durata de 72 ore a perioadei de testare. Acest lucru corespunde unei viteze specifice de creștere de 0,92 zi^{-1}. În cazul speciilor utilizate cel mai frecvent, viteza de creștere este de obicei considerabil mai mare (a se vedea apendicele 2). Este posibil ca acest criteriu să nu fie respectat atunci când sunt folosite specii care cresc mai lent decât cele prezentate în apendicele 2. În acest caz, perioada de testare ar trebui extinsă pentru a fi obținută o creștere de cel puțin 16 ori în culturile de control, creșterea trebuind să fie exponențială pe parcursul întregii perioade de testare. Atât timp cât se atinge factorul minim de multiplicare 16, perioada de testare poate fi redusă la cel puțin 48 de ore în scopul menținerii creșterii exponențiale nelimitate în timpul testului.

— Coeficientul mediu de variație pentru vitezele specifice de creștere pe secțiuni (zilele 0-1, 1-2 și 2-3 pentru testele de 72 ore) în culturile de control (a se vedea apendicele 1 la „coeficient de variație”) nu trebuie să depășească 35 %. Pentru calcularea vitezei specifice de creștere pe secțiuni, a se vedea punctul 49. Acest criteriu se aplică valorii medii a coeficienților de variație calculați pentru culturile de control duplicate.

— Coeficientul de variație al vitezelor medii specifice de creștere a culturilor de control duplicate nu trebuie să depășească 7 % la testele cu *Pseudokirchneriella subcapitata* și *Desmodesmus subspicatus* pe parcursul întregii perioade de testare. În cazul altor specii mai puțin testate, valoarea nu ar trebui să depășească 10 %.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

12. Substanța (substanțele) chimică (chimice) de referință, cum ar fi 3,5-diclorfenolul folosit în ring testul internațional (1), poate (pot) fi testată (testate) ca metodă de verificare a procedurii de testare. Dicromatul de potasiu poate fi folosit, de asemenea, ca substanță chimică de referință pentru algele verzi. Este de preferat ca o substanță chimică de referință să fie testată de cel puțin două ori pe an.

APLICABILITATEA TESTULUI

13. Această metodă de testare se aplică cel mai ușor în cazul substanțelor chimice solubile în apă care, în condițiile testului, sunt susceptibile să rămână în apă. În cazul testării de substanțe chimice volatile, puternic adsorbante, colorate, cu o solubilitate scăzută în apă sau substanțe chimice

▼M6

care pot afecta disponibilitatea nutrienților sau a mineralelor în mediul de testare, pot fi necesare anumite modificări ale procedurii de testare descrise (de exemplu sistem închis, condiționarea vaselor de testare). Orientări privind unele modificări adecvate se găsesc în lucrările (2), (3) și (4).

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Aparatură

14. Vasele de testare și alte echipamente care vor veni în contact cu soluțiile de testare ar trebui să fie în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. Obiectele ar trebui să fie foarte bine spălate pentru prevenirea efectelor contaminanților organici sau anorganici asupra creșterii algelor sau a compoziției soluțiilor de testare.

15. Vasele de testare vor fi în mod normal flacoane din sticlă de dimensiuni cuprinzând un volum suficient de cultură pentru măsurătorile din cursul testului și permițând un transfer suficient de masă de CO_2 din atmosferă (a se vedea punctul 30). Trebuie reținut că volumul de lichid trebuie să fie suficient pentru efectuarea determinărilor analitice (a se vedea punctul 37).

16. În afară de acestea, pot fi necesare unele sau toate echipamentele următoare:

— Echipamente pentru cultură: se recomandă un dulap sau o încăpere în care să se poată menține temperatura de incubație aleasă la ± 2 °C.

— Instrumente de măsurare a luminii: este important de remarcat că metoda de măsurare a intensității luminii și, în special, tipul de receptor (colector) pot influența valoarea măsurată. Măsurătorile ar trebui făcute preferabil prin folosirea unui receptor sferic (4 π) (care răspunde la lumina directă și reflectată provenită din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare), sau a unui receptor 2 π (care răspunde la lumina provenită din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare).

— Aparatură pentru determinarea biomasei de alge. Numărul celulelor, care este cel mai frecvent utilizat parametru înlocuitor pentru biomasa de alge, poate fi obținut prin folosirea unui contor electronic de particule, a unui microscop cu cameră de numărare sau a unui citometru de flux. Alți înlocuitori de biomasă se pot măsura folosind un citometru de flux, fluorimetru, spectrofotometru sau colorimetru. Este utilă calcularea unui factor de conversie care să stabilească relația dintre numărul de celule și greutatea uscată. Pentru a se obține rezultate utile ale măsurătorilor la concentrații scăzute de biomasă atunci când se folosește un spectrofotometru, poate fi necesară folosirea de cuve cu un traseu al razelor luminoase de cel puțin 4 cm.

Organismele de testare

17. Se pot folosi câteva specii de microalge și cianobacterii neatașate. S-a demonstrat că sușele enumerate în apendicele 2 sunt adecvate prin folosirea procedurii de testare specificate în această metodă de testare.

18. Dacă se folosesc alte specii, ar trebui raportate sușa și/sau originea. Trebuie să se confirme că creșterea exponențială a algelor de testare selectate poate fi menținută pe parcursul întregii perioade de testare, în condițiile predominante.

Mediul de cultură

19. Se recomandă două medii alternative de cultură, mediul OCDE și mediul AAP. Compozițiile acestor medii sunt prezentate în apendicele 3. Trebuie reținut că valoarea inițială a pH-ului și capacitatea de tamponare (care reglează creșterea pH-ului) pentru cele două medii sunt diferite. Prin urmare, rezultatele testelor pot fi diferite, în funcție de mediul folosit, în special în cazul testării de substanțe chimice ionizante.

▼M6

20. Modificarea mediilor de cultură poate fi necesară pentru anumite scopuri, cum ar fi situațiile în care se testează metale și agenți de chelare sau la valori diferite ale pH-ului. Folosirea unui mediu modificat ar trebui descrisă în detaliu și justificată (3) (4).

Concentrația biomasei inițiale

21. Biomasa inițială din culturile de testare trebuie să fie egală în toate aceste culturi și suficient de scăzută pentru a permite creșterea exponențială pe parcursul întregii perioade de incubație fără riscul de epuizare a nutrienților. Biomasa inițială nu ar trebui să depășească 0,5 mg/l ca greutate uscată. Se recomandă următoarele concentrații celulare inițiale:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ celule/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$ celule/ml
Navicula pelliculosa	10^4 celule/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 celule/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ celule/ml

Concentrațiile substanței chimice de testare

22. Intervalul de concentrație în care pot apărea efecte poate fi stabilit pe baza rezultatelor testelor de stabilire a intervalului. Pentru testul definitiv final ar trebui selectate cel puțin cinci concentrații dispuse în serie geometrică cu un factor care să nu depășească 3,2. Pentru substanțele chimice de testare care prezintă o curbă concentrație-răspuns constantă poate fi justificat un factor mai mare. Seriile de concentrații ar trebui să acopere, de preferat, intervalul care provoacă o inhibare de 5-75 % a vitezei de creștere a algelor.

Probe duplicat și probe de control

23. Proiectul testului ar trebui să includă trei probe duplicat la fiecare concentrație de testare. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, proiectul testului poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și reducerea numărului de probe duplicat per concentrație. Numărul de probe de control duplicate trebuie să fie de cel puțin trei, recomandându-se să depășească de două ori numărul probelor duplicat folosite pentru fiecare concentrație de testare.

24. Pentru determinările analitice ale concentrațiilor substanței chimice de testare se poate pregăti un set separat de soluții de testare (a se vedea punctele 36 și 38).

25. Dacă se utilizează un solvent pentru solubilizarea substanței chimice de testare, în proiectul testului trebuie incluse probe de control suplimentare conținând solventul în aceeași concentrație cu cea folosită în cazul culturilor de testare.

Pregătirea culturii de inocul

26. În scopul adaptării algei testate la condițiile de testare și al asigurării faptului că algele se află în faza de creștere exponențială când sunt folosite pentru inocularea soluțiilor de testare, se pregătește o cultură de inocul în mediul de testare cu 2-4 zile înainte de începerea testului. Biomasa de alge ar trebui ajustată pentru a permite creșterii exponențiale să predomine în cultura de inocul până la începerea testului. Cultura de inocul trebuie incubată în aceleași condiții ca și culturile de testare. Se măsoară creșterea biomasei din cultura de inocul pentru a se verifica dacă creșterea se încadrează în

▼M6

intervalul normal pentru suşa testată în condiţiile de cultură. Un exemplu al procedurii pentru cultura algelor este descris în apendicele 4. Pentru a se evita diviziunile celulare sincrone în timpul testului, poate fi necesară o a doua etapă de propagare a culturii de inocul.

Pregătirea soluţiilor de testare

27. Toate soluţiile de testare trebuie să conţină aceleaşi concentraţii de mediu de cultură şi de biomasă iniţială a algelor testate. Soluţiile de testare ale concentraţiilor alese se pregătesc de obicei prin amestecarea unei soluţii stoc a substanţei chimice de testare cu mediu de cultură şi cultură de inocul. De obicei, soluţiile stoc se pregătesc prin dizolvarea substanţei chimice în mediul de testare.

28. Solvenţii, cum ar fi acetona, alcoolul terţ-butilic şi dimetil-formamida, pot fi folosiţi ca soluţie vehicul pentru adăugarea în mediul de testare de substanţe chimice cu solubilitate scăzută în apă (2)(3). Concentraţia solventului nu trebuie să depăşească 100 µl/l, aceeaşi concentraţie de solvent adăugându-se în toate culturile (inclusiv în probele de control) din seria de testare.

Incubaţia

29. Se acoperă vasele de testare cu capace care permit trecerea aerului. Vasele se agită, după care se introduc în echipamentul pentru cultură. Este necesar ca, în timpul testului, algele să fie menţinute în suspensie şi să se faciliteze transferul de CO_2. În acest scop, se vor folosi mişcări de agitare şi amestecare constante. Culturile ar trebui menţinute la o temperatură cuprinsă între 21 şi 24 °C, controlate la ± 2 °C. În cazul altor specii decât cele enumerate în apendicele 2, cum ar fi specii tropicale, pot fi adecvate temperaturi mai ridicate, cu condiţia îndeplinirii criteriilor de validitate. Se recomandă ca flacoanele să fie aşezate aleatoriu şi repoziţionate în fiecare zi în incubator.

30. PH-ul mediului de control nu trebuie să crească cu mai mult de 1,5 unităţi în timpul testului. În cazul metalelor şi substanţelor chimice care se ionizează parţial la un pH aproximativ egal cu pH-ul de testare, poate fi necesară limitarea devierii pH-ului în scopul obţinerii de rezultate reproductibile şi bine definite. O deviere de < 0,5 unităţi de pH este posibilă din punct de vedere tehnic şi poate fi obţinută prin asigurarea unei viteze adecvate de transfer de masă CO_2 din aerul înconjurător către soluţia de testare, de exemplu prin creşterea vitezei de agitare. O altă posibilitate constă în reducerea necesarului de CO_2 prin reducerea biomasei iniţiale sau a duratei testului.

31. Suprafaţa unde sunt incubate culturile trebuie să primească iluminare fluorescentă continuă şi uniformă, de tipul celei „alb-rece” sau „lumina zilei”. Suşele de alge şi cianobacterii sunt diferite din punctul de vedere al necesarului de lumină. Intensitatea luminii se selectează la un nivel adecvat pentru organismul de testare folosit. În cazul speciilor recomandate de alge verzi, intensitatea luminii la nivelul soluţiilor de testare se selectează în intervalul 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ când se măsoară în intervalul de lungimi de undă eficient din punct de vedere fotosintetic de 400-700 nm, folosindu-se un receptor corespunzător. Unele specii, în special *Anabaena flos-aquae*, cresc bine la intensităţi scăzute ale luminii şi pot fi afectate negativ la intensităţi ridicate. În cazul unor astfel de specii se selectează o intensitate luminoasă medie în intervalul 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (În cazul instrumentelor de măsurare a luminii calibrate în lux, un interval echivalent de 4 440-8 880 lucşi pentru lumină albă rece corespunde aproximativ intensităţii luminoase recomandate de 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Intensitatea luminoasă trebuie menţinută la ± 15 % de intensitatea luminoasă medie de deasupra zonei de incubaţie.

▼M6

Durata testului

32. Durata normală a testului este de 72 de ore. Cu toate acestea, pot fi folosite durate mai lungi sau mai scurte ale testului, cu condiția respectării tuturor criteriilor de validitate de la punctul 11.

Măsurători și determinări analitice

33. Biomasa de alge din fiecare flacon se determină cel puțin o dată pe zi în timpul perioadei de testare. Dacă măsurătorile se fac pe volume mici, extrase din soluția de testare cu o pipetă, acestea nu se înlocuiesc.

34. Măsurarea biomasei are loc prin numărarea manuală a celulelor cu ajutorul unui microscop sau al unui contor electronic de particule (în funcție de numărul de celule și/sau de biovolum). Tehnici alternative, cum ar fi citometria de flux, fluorescența clorofilei *in vitro* sau *in vivo* (5) (6) sau densitatea optică, pot fi folosite dacă se demonstrează o corelație satisfăcătoare cu biomasa pentru intervalul de cantități de biomasă prezente în test.

35. PH-ul soluțiilor se măsoară la începutul și la sfârșitul testului.

36. Dacă este disponibilă o procedură analitică de determinare a substanței chimice de testare în intervalul de concentrație utilizat, soluțiile de testare ar trebui analizate pentru a fi verificate concentrațiile inițiale și menținerea concentrațiilor de expunere în timpul testului.

37. Analizarea concentrației substanței chimice de testare la începutul și la sfârșitul testului unei concentrații de testare scăzute și înalte, precum și o concentrație în jurul valorii anticipate EC_{50} pot fi suficiente în cazurile în care este probabil ca variația concentrațiilor de expunere să fie de mai puțin de 20 % față de valorile nominale din timpul testului. Analizarea tuturor concentrațiilor de testare la începutul și la sfârșitul testului este recomandată în cazul concentrațiilor care nu rămân în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală. În cazul substanțelor chimice de testare volatile, instabile sau puternic adsorbante, se recomandă recoltarea suplimentară de probe la intervale de 24 de ore în timpul perioadei de expunere în scopul definirii cu mai mare precizie a pierderii de substanță chimică de testare. Pentru aceste substanțe chimice sunt necesare probe duplicat suplimentare. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare trebuie efectuată doar în unul dintre vasele conținând probe duplicat la fiecare concentrație de testare (sau în conținutul vaselor grupate în funcție de proba duplicat).

38. Mediile de testare pregătite special pentru analiza concentrațiilor de expunere în timpul testului ar trebui tratate identic cu cele folosite pentru testare, adică ar trebui să se inoculeze cu alge și să fie incubate în condiții identice. Dacă este necesară analiza concentrației substanței chimice de testare dizolvate, se poate impune separarea algelor de mediu. Este de preferat ca separarea să aibă loc prin centrifugare la o forță gravitațională scăzută, suficientă pentru depunerea algelor.

39. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a ± 20 % din cea nominală sau măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația inițială nominală sau măsurată nu se află în limita a ± 20 %, analiza rezultatelor ar trebui să fie bazată pe media geometrică a concentrației din timpul expunerii sau pe modelele care descriu scăderea concentrației substanței chimice testate (3)(7).

▼M6

40. Testul de inhibare a creşterii algelor este un sistem de testare mai dinamic decât majoritatea testelor de toxicitate acvatică pe termen scurt. Prin urmare, concentraţiile de expunere reale se pot dovedi dificil de definit, în special în cazul substanţelor chimice adsorbante testate la concentraţii scăzute. În astfel de cazuri, dispariţia substanţei chimice de testare din soluţie prin adsorbţie în biomasa de alge în creştere nu înseamnă că aceasta s-a pierdut din sistemul de testare. În cursul analizării rezultatului testului, ar trebui să se verifice dacă o scădere a concentraţiei substanţei chimice de testare în cursul testului este însoţită de o reducere a inhibării creşterii. Dacă acesta este cazul, poate fi luată în considerare aplicarea unui model adecvat de descriere a scăderii concentraţiei substanţei chimice de testare (7). Dacă nu este cazul, analizarea rezultatelor se poate întemeia pe valorile concentraţiilor iniţiale (nominale sau măsurate).

Alte observaţii

41. Observaţia microscopică se efectuează în scopul verificării stării normale şi sănătoase a culturii de inocul şi pentru observarea oricărei stări anormale a algelor (care poate fi provocată de expunerea la substanţa chimică de testare) la sfârşitul testului.

Test la valori-limită

42. În unele condiţii, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanţa chimică de testare nu are efecte toxice la concentraţii de până la 100 mg/l sau până la limita solubilităţii sale în mediul de testare (oricare dintre ele este mai scăzută), se poate realiza un test la valori-limită, care presupune compararea răspunsurilor unui grup de control şi ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentraţie egală cu limita solubilităţii). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analiza concentraţiei de expunere. Unui test la valori-limită i se aplică toate condiţiile de testare şi criteriile de validitate descrise anterior, cu excepţia faptului că numărul de probe duplicat supuse tratamentului ar trebui să fie de cel puţin şase. Variabilele de răspuns din grupul de control şi din cel supus tratamentului pot fi analizate folosind un test statistic de comparare a mediilor, cum ar fi un test t (Student). Dacă varianţele acestor două grupuri sunt inegale, ar trebui să se efectueze un test t ajustat pentru varianţe inegale.

DATE ŞI RAPORT

Reprezentarea grafică a curbelor de creştere

43. Biomasa din vasele de testare poate fi exprimată în unităţi ale parametrului înlocuitor folosit pentru măsurare (de exemplu numărul de celule, fluorescenţa).

44. Concentraţia estimată a biomasei din culturile de testare şi probele de control se prezintă sub forma unui tabel, împreună cu concentraţiile materialului de testare şi perioadele de măsurare, înregistrate cu o rezoluţie de cel puţin ore întregi, pentru a produce grafice ale curbelor de creştere. Ambele scări, logaritmică şi liniară, pot fi utile în această primă etapă, dar scările logaritmice sunt obligatorii şi, în general, prezintă mai bine variaţiile modelului de creştere în timpul perioadei de testare. Trebuie reţinut că creşterea exponenţială este reprezentată ca o linie dreaptă când se face reprezentarea grafică la scară logaritmică, iar înclinaţia liniei (panta) indică viteza specifică de creştere.

45. Folosind graficele, se examinează dacă, pe parcursul întregului test, culturile de control cresc exponenţial la viteza prevăzută. Se examinează critic toate punctele de date şi aspectul graficelor şi se verifică datele brute şi procedurile pentru identificarea posibilelor erori. Se verifică, în special, orice punct de date care pare să devieze printr-o eroare sistematică. Dacă este evident că pot fi identificate erori de procedură şi/sau acestea sunt considerate foarte probabile, punctul de date în cauză se marchează ca valoare excepţională şi nu se include în analiza statistică ulterioară. (O

▼M6

concentrație a algelor egală cu zero în unul din două sau trei vase duplicate poate arăta că vasul nu a fost inoculat corect sau nu a fost curățat corespunzător.) Motivele respingerii unui punct de date ca fiind valoare excepțională se indică în mod clar în raportul de testare. Motivele acceptate sunt numai erorile (rare) de procedură, nu simpla imprecizie. Procedurile statistice de identificare a valorilor excepționale au aplicabilitate limitată pentru acest tip de problemă și nu pot înlocui raționamentul calificat. Se preferă ca valorile excepționale (marcate ca atare) să fie reținute între punctele de date ilustrate în orice prezentare grafică sau tabelară ulterioară a datelor.

Variabile de răspuns

46. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testare asupra creșterii algelor. Această metodă de testare descrie două variabile de răspuns, deoarece diferitele jurisdicții au preferințe și cerințe de reglementare diferite. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile în toate jurisdicțiile, efectele se evaluează folosind ambele variabile de răspuns (a) și (b) descrise mai jos.

(a) Viteza medie specifică de creștere: această variabilă de răspuns se calculează pe baza creșterii logaritmice a biomasei în timpul perioadei de testare, exprimată pe zi.

(b) Randamentul: această variabilă de răspuns reprezintă biomasa de la sfârșitul testului minus biomasa de la începutul testului.

47. Trebuie remarcat că valorile de toxicitate calculate prin folosirea acestor două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență trebuie să fie recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în general mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) în cazul în care condițiile de testare din această metodă de testare sunt respectate, ca urmare a bazei matematice a abordărilor respective. Aceasta nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic. Conceptul de viteză medie specifică de creștere se bazează pe modelul general al creșterii exponențiale a algelor în culturi nelimitate, în care toxicitatea se estimează pe baza efectelor asupra vitezei de creștere, fără a fi dependentă de nivelul absolut al vitezei specifice de creștere a probei de control, de panta curbei concentrație-răspuns sau de durata testului. Prin contrast, rezultatele bazate pe variabila de răspuns a randamentului depind de toate aceste variabile. E_yC_x depinde de viteza specifică de creștere a speciilor de alge folosite pentru fiecare test și de viteza maximă specifică de creștere, care poate varia între specii și chiar între sușe diferite de alge. Această variabilă de răspuns nu ar trebui folosită pentru compararea sensibilității la substanțe toxice între specii de alge sau chiar sușe diferite. În timp ce folosirea vitezei medii specifice de creștere în scopul estimării toxicității este preferată din punct de vedere științific, estimările de toxicitate bazate pe randament sunt de asemenea incluse în această metodă de testare pentru a satisface cerințele de reglementare actuale din unele țări.

Viteza medie de creștere

48. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a biomasei, pe baza ecuației pentru fiecare vas de probe de control și de probe supuse tratamentului [1]:

▼**M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{zi}^{-1}) \qquad [1],$$

unde:

μ_{i-j} este viteza medie specifică de creștere de la momentul *i* la momentul *j*;

X_i este biomasa la momentul *i*;

X_j este biomasa la momentul *j*.

Pentru fiecare grup supus tratamentului și pentru fiecare grup de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările variației.

49. Se calculează viteza medie specifică de creștere pentru întreaga durată a testului (în mod normal, zilele 0-3), folosind biomasa inoculată nominal ca valoare inițială în locul unei valori inițiale măsurate, în acest mod obținându-se de obicei o precizie mai mare. Dacă dispozitivul folosit pentru măsurarea biomasei permite o determinare suficient de precisă a biomasei scăzute de inocul (de exemplu citometru de flux), se poate folosi concentrația măsurată a biomasei inițiale. De asemenea, se evaluează viteza de creștere pe secțiuni, calculată ca viteze specifice de creștere pentru fiecare zi din perioada testului (zilele 0-1, 1-2 și 2-3) și se examinează dacă viteza de creștere a probei de control rămâne constantă (a se vedea criteriile de validitate, punctul 11). O viteză specifică de creștere semnificativ mai scăzută în prima zi decât viteza medie specifică de creștere poate indica o fază de latență. În timp ce o fază de latență poate fi minimizată și, practic, eliminată din culturile de control prin propagarea adecvată a preculturii, o fază de latență la culturile expuse poate indica recuperarea după un stres toxic inițial sau o expunere redusă ca urmare a pierderii de substanță chimică de testare (inclusiv sorbție în biomasa de alge) după expunerea inițială. Prin urmare, viteza de creștere pe secțiuni poate fi estimată în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se manifestă în timpul perioadei de expunere. Diferențe substanțiale între viteza de creștere pe secțiuni și viteza medie de creștere indică o deviere de la creșterea exponențială constantă și impun examinarea atentă a curbelor de creștere.

50. Inhibarea procentuală a vitezei de creștere pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului se calculează pe baza ecuației [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

unde:

$\%I_r$ = inhibarea procentuală a vitezei specifice de creștere;

μ_C = valoarea medie a vitezei medii specifice de creștere (μ) în grupul de control;

μ_T = viteza medie specifică de creștere pentru proba duplicat supusă tratamentului.

51. Când se folosesc solvenți pentru pregătirea soluțiilor de testare, pentru calcularea inhibării procentuale se folosesc probele de control cu solvenți în locul probelor de control fără solvenți.

Randamentul

52. Randamentul se calculează ca biomasa de la sfârșitul testului minus biomasa de la începutul testului în cazul fiecărui vas de probe de control și probe supuse tratamentului. Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările variației. Inhibarea procentuală a randamentului ($\%I_y$) se poate calcula pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, după cum urmează:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

unde:

$\%\ I_y$ = inhibarea procentuală a randamentului;

Y_C = valoarea medie a randamentului la grupul de control;

Y_T = valoarea randamentului pentru proba duplicat supusă tratamentului.

Reprezentarea grafică a curbei concentrație-răspuns

53. Se reprezintă grafic procentajul de inhibare în funcție de logaritmul concentrației substanței chimice de testare și se examinează graficul cu atenție, ignorându-se toate punctele de date care au fost indicate ca valori excepționale în prima fază. Punctele de date se unesc printr-o curbă, manual sau prin interpolare computerizată, pentru a se obține o primă impresie asupra relației concentrație-răspuns, apoi se continuă cu o metodă mai detaliată, preferabil o metodă statistică computerizată. În funcție de utilizarea prevăzută a datelor, de calitatea (precizia) și cantitatea de date, precum și de disponibilitatea instrumentelor de analiză a datelor, se poate decide (uneori, bine justificat) oprirea analizei datelor în această etapă și se citesc doar cifrele cheie EC_{50} și EC_{10} (și/sau EC_{20}) de pe curba trasată manual (a se vedea și punctul de mai jos despre efectele stimulatorii). Motivele valide de a nu folosi o metodă statistică pot include:

— datele nu sunt adecvate pentru ca metodele computerizate să producă rezultate mai precise decât pot fi obținute prin raționament calificat – în astfel de situații, unele programe informatice pot chiar să nu producă o soluție fiabilă (iterațiile pot să nu conveargă etc.);

— răspunsurile de creștere stimulatorie nu pot fi prelucrate în mod adecvat prin folosirea programelor informatice disponibile (a se vedea mai jos).

Proceduri statistice

54. Obiectivul este de a se obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns – de exemplu în funcția probit, logit sau unități Weibull (8), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile netede. Când se apropie de zero sau în cazul unei inhibiții totale, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (8). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se utilizează în cazul datelor binare (de exemplu date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a putea fi aplicate la datele despre creștere sau biomasă. Proceduri specifice de determinare a valorilor EC_x pe baza datelor continue se găsesc în lucrările (9), (10) și (11). Utilizarea analizei regresiei neliniare este descrisă mai amănunțit în apendicele 5.

55. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor EC_x. Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supuse tratamentului. Dacă totuși interpolarea neliniară este

▼M6

dificilă sau eșuează ca urmare a datelor prea dispersate, problema poate fi ocolită prin efectuarea regresiei pe medii de grup, aceasta fiind o metodă practică de reducere a influenței valorilor excepționale suspectate. Folosirea acestei opțiuni se consemnează în raportul de testare ca abatere de la procedura normală, deoarece regresia curbei pe baza probelor duplicat individuale nu a produs un rezultat corect.

56. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute și folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (13), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.

57. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, pentru efectele substanței chimice de testare asupra vitezei de creștere, este necesară compararea mediilor probelor supuse tratamentului folosind tehnici de analiză a varianței (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație trebuie comparată apoi cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau cel al lui Williams poate fi util în acest sens (12)(14)(15)(16)(17). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a varianței se verifică. Această evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (17). Teste adecvate sunt cel al lui Levene sau al lui Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a varianțelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea varianței este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analiza prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC se găsesc în referința (11).

58. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de abandonare a conceptului de NOEC și înlocuirea sa cu estimările punctuale EC_x bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a x pentru acest test cu alge. Un interval cuprins între 10 și 20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabila de răspuns aleasă) și se recomandă raportarea atât a EC_{10}, cât și a EC_{20}.

Stimularea creșterii

59. Se observă uneori o stimulare a creșterii (inhibare negativă) la concentrații scăzute. Aceasta poate rezulta fie din hormeză („stimulare toxică”), fie în urma adăugării de factori de creștere stimulatori odată cu materialul de testare în mediul minimal folosit. Trebuie reținut că adăugarea de nutrienți anorganici nu ar trebui să aibă niciun efect direct, deoarece mediul de testare ar trebui să își mențină un surplus de nutrienți pe parcursul întregului test. Stimularea cu doze scăzute poate fi ignorată de obicei în calculele EC_{50} cu excepția cazurilor când este extremă. Cu toate acestea, dacă este extremă sau trebuie să se calculeze o valoare EC_x pentru x scăzut, pot fi necesare proceduri speciale. Ștergerea răspunsurilor stimulatorii din analiza datelor ar trebui să fie evitată dacă este posibil, iar dacă software-ul disponibil de interpolare a curbei nu poate accepta o stimulare minoră, se poate utiliza interpolarea liniară cu „bootstrap”. Dacă stimularea este extremă, poate fi luată în considerare folosirea unui model hormetic (18).

Inhibarea netoxică a creșterii

60. Materialele de testare fotoabsorbante pot determina o reducere a vitezei de creștere, deoarece umbra reduce cantitatea de lumină disponibilă. Astfel de tipuri de efecte fizice trebuie să fie separate de efectele toxice prin modificarea condițiilor de testare, iar primele se raportează separat. Orientări în acest sens se găsesc în lucrările (2) și (3).

RAPORTUL DE TESTARE

61. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

▼**M6**

Substanța chimică de testare:

— starea fizică și proprietățile fizico-chimice relevante, inclusiv limita solubilității în apă;

— datele de identificare a substanței chimice (de exemplu numărul CAS), inclusiv puritatea (impuritățile).

Speciile folosite pentru testare:

— sușa, furnizorul sau sursa și condițiile de cultură folosite.

Condiții de testare:

— data de începere a testului și durata sa;

— descrierea proiectului testului: vasele de testare, volumele de cultură, densitatea biomasei la începutul testului;

— compoziția mediului;

— concentrațiile de testare și probele duplicat (de exemplu numărul de probe duplicat, numărul concentrațiilor de testare și progresia geometrică utilizată);

— descrierea modului de preparare a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea de solvenți etc.;

— echipamentul pentru cultură;

— intensitatea și calitatea luminii (sursa, omogenitatea);

— temperatura;

— concentrațiile testate: concentrațiile de testare nominale și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice de testare în vasele de testare. Ar trebui raportate eficiența de recuperare a metodei și limita de cuantificare în matricea de testare;

— orice abatere de la prezenta metodă de testare;

— metoda de determinare a biomasei și dovada corelației dintre parametrul măsurat și greutatea uscată;

Rezultatele:

— valorile pH-ului la începutul și la sfârșitul testului, pentru toate tipurile de tratament;

— biomasa pentru fiecare flacon la fiecare punct de măsurare și pentru fiecare metodă de măsurare a biomasei;

— curbele de creștere (graficul biomasei în funcție de timp);

— variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;

— prezentarea grafică a relației concentrație-efect;

▼M6

— estimările toxicității pentru variabilele de răspuns, de exemplu EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și NOEC, precum și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;

— dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);

— orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;

— orice alt efect observat, cum ar fi modificările morfologice ale algelor;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

În sensul prezentei metode de testare se folosesc următoarele definiții și abrevieri:

„Biomasă” înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație, exprimată în termenii unui volum dat; de exemplu mg alge/litru de soluție de testare. De obicei, „biomasa” se definește ca masă, dar în acest test acest cuvânt desemnează masa per volum. Tot în acest test, se măsoară de obicei înlocuitorii pentru biomasă, cum ar fi numărul de celule, fluorescența etc., iar folosirea termenului „biomasă” se referă așadar și la măsurarea acestor înlocuitori.

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„Coeficient de variație” înseamnă o măsură adimensională a variabilității unui parametru, definită ca raportul dintre deviația standard și medie. Acesta se poate exprima și ca valoare procentuală. Coeficientul mediu de variație al vitezei medii specifice de creștere în culturile de control duplicat ar trebui calculat după cum urmează:

1. Se calculează % CV al vitezei medii specifice de creștere din vitezele de creștere zilnice/pe secțiuni la probele duplicat respective;

2. Se calculează valoarea medie a tuturor valorilor calculate la punctul 1 pentru a se obține coeficientul mediu de variație a vitezei specifice de creștere pe zi/pe secțiuni la culturile de control duplicat.

„EC_x” înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu 50 %) a creșterii organismului de testare într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a denota o valoare EC derivată din viteza de creștere sau din randament se utilizează simbolurile „E_rC” pentru viteza de creștere și „E_yC” pentru randament.

„Mediu de cultură” înseamnă mediul de cultură complet sintetic în care cresc algele testate când sunt expuse unei substanțe chimice de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

„Viteză de creștere” (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere.

„Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)” înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Dacă aceste două condiții nu pot fi satisfăcute, trebuie să se furnizeze o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC).

„Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC)” înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

„Variabilă de răspuns” înseamnă o variabilă pentru estimarea toxicității, derivată din oricare dintre parametrii măsurați care descriu biomasa prin diferite metode de calcul. În cazul prezentei metode de testare, vitezele de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din măsurarea directă a biomasei sau a oricăruia dintre înlocuitorii menționați.

▼**M6**

„Viteză specifică de creștere” înseamnă o variabilă de răspuns definită ca raportul dintre diferența dintre logaritmii naturali ai unui parametru de observație (biomasa, în prezenta metodă de testare) și perioada de timp corespunzătoare.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

„Randament” înseamnă valoarea unei variabile de măsurare la sfârșitul perioadei de expunere minus valoarea variabilei de măsurare la începutul perioadei de expunere, pentru exprimarea creșterii biomasei în timpul testului.

▼**M6**

Apendicele 2

Suşe demonstrate ca fiind adecvate pentru test

Alge verzi

Pseudokirchneriella subcapitata (cunoscută anterior ca *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (cunoscută anterior ca *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Diatomee

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cianobacterii

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Surse de suşe

Suşele recomandate sunt disponibile în culturi cu un singur tip de alge din următoarele colecţii (în ordine alfabetică):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
SUA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Regatul Unit

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
GERMANIA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
SUA

▼M6

Aspectul și caracteristicile speciilor recomandate

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspect	Curbat, celule izolate răsucite	Oval, în mare parte celule izolate	Bastonașe	Lanțuri de celule ovale	Bastonașe
Dimensiune (L × l) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volumul celulelor (μm^3/celulă)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Greutatea uscată a celulelor (mg/celulă)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
Viteza de creștere (3) (zi^{-1})	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Măsurat cu contor electronic de particule.
(2) Calculat pe baza dimensiunii.
(3) Cea mai frecvent observată viteză de creștere în mediul OCDE la o intensitate luminoasă de aprox. 70 µE m^{-2} s^{-1} și 21 °C.

Recomandări specifice privind cultura și manipularea speciilor de testare recomandate

Pseudokirchneriella subcapitata și Desmodesmus subspicatus

Aceste alge verzi sunt, în general, ușor de întreținut în diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi. În mod normal, celulele sunt solitare, iar măsurătorile densității celulelor pot fi efectuate cu ușurință folosind un contor electronic de particule sau un microscop.

Anabaena flos-aquae

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Este foarte important să nu se permită lotului de cultură să depășească faza de dezvoltare logaritmică în etapa de reînnoire, recuperarea fiind dificilă în acest stadiu.

Anabaena flos-aquae dezvoltă agregate de lanțuri de celule în serie. Dimensiunea acestor agregate poate varia în funcție de condițiile de cultură. Separarea acestor agregate poate fi necesară în timpul numărării la microscop sau când se folosește un contor electronic de particule pentru determinarea biomasei.

Pentru desfacerea lanțurilor în vederea reducerii variabilității numărului se poate utiliza sonicarea subeșantioanelor. O sonicare mai îndelungată decât cea necesară pentru desfacerea lanțurilor în lungimi mai mici poate avea ca efect distrugerea celulelor. Intensitatea și durata sonicării trebuie să fie identice în cazul fiecărui tratament.

Se vor număra suficiente câmpuri pe hemocitometru (cel puțin 400 de celule) pentru a se compensa variabilitatea. Aceasta va ameliora fiabilitatea determinărilor microscopice ale densității.

După desfacerea lanțurilor de celule prin dezintegrare prudentă cu ultrasunete, volumul total de celule de *Anabaena* se va putea determina folosind un contor electronic de particule. Energia dezintegrării cu ultrasunete trebuie ajustată pentru a se preveni distrugerea celulelor.

Folosiți un agitator Vortex sau o metodă adecvată similară pentru a vă asigura că suspensia de alge utilizată pentru inocularea vaselor de testare este bine amestecată și omogenă.

▼**M6**

Vasele de testare se așează pe o masă de agitare orbitală sau oscilantă la aproximativ 150 de rotații pe minut. În mod alternativ, tendința *Anabaena* de a se agrega poate fi prevenită prin agitare intermitentă. Dacă se produce agregarea, eșantioanele reprezentative pentru măsurătorile de biomasă trebuie selectate cu atenție. Poate fi necesară agitarea cu putere înainte de recoltarea probelor pentru a dezintegra agregatele de alge.

Synechococcus leopoliensis

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi.

Synechococcus leopoliensis crește sub formă de celule solitare în formă de bastonașe. Celulele sunt foarte mici, ceea ce îngreunează numărarea acestora la microscop în scopul măsurării biomasei. Sunt utile contoarele electronice de particule calibrate pentru numărarea particulelor cu o dimensiune de aproximativ 1 μm. Se pot folosi, de asemenea, măsurători fluorometrice *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Pentru păstrarea unei culturi stoc pot fi folosite diferite medii de cultură. Informații privind mediile adecvate sunt disponibile la colecțiile de culturi. A se avea în vedere că în mediu este necesară prezența silicatului.

Navicula pelliculosa poate forma agregate în anumite condiții de creștere. Ca urmare a producției de lipide, celulele algelor tind uneori să se acumuleze în pelicula de suprafață. În această situație, se vor adopta măsuri speciale pentru obținerea de eșantioane reprezentative când se recoltează subeșantioane pentru determinarea biomasei. Poate fi necesară agitarea cu putere, de exemplu, cu ajutorul unui agitator Vortex.

▼**M6**

Apendicele 3

Medii de cultură

Se poate folosi unul dintre următoarele două medii de cultură:

— mediul OCDE: mediul original al Orientării OCDE privind testarea nr. 201, conform și cu ISO 8692;

— mediul AAP al EPA SUA, conform și cu ASTM.

Pentru pregătirea acestor medii se folosesc reactivi sau substanțe chimice de puritate analitică și apă deionizată.

Compoziția mediului AAP (EPA SUA) și a mediului conform cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 201.

Componentă	AAP		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Raportul molar EDTA/fier depășește ușor unitatea. Aceasta previne precipitarea fierului și, în același timp, este minimizată chelarea ionilor de metale grele.

În testul cu diatomeea *Navicula pelliculosa*, ambele medii trebuie să fie suplimentate cu $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ pentru a se obține o concentrație de 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

PH-ul mediului se obține la echilibrul dintre sistemul carbonat al mediului și presiunea parțială a CO_2 în aerul atmosferic. O relație aproximativă între pH la 25 °C și concentrația molară a bicarbonatului este:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Cu 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (mediul EPA SUA) și cu 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (mediul OCDE).

Compoziția elementară a mediilor de testare

Element	AAP	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Pregătirea mediului OCDE

Nutrient	Concentrația în soluția stoc
Soluția stoc nr. 1: macronutrienți	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Soluția stoc nr. 2: fier	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Soluția stoc nr. 3: microelemente	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutrient	Concentrația în soluția stoc
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Soluția stoc nr. 4: bicarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Soluțiile stoc se sterilizează prin filtrarea prin membrană (diametrul mediu al porilor 0,2 μm) sau în autoclavă (120 °C, 15 min). Soluțiile se depozitează la întuneric la 4 °C.

Soluțiile stoc nr. 2 și 4 nu se sterilizează în autoclavă, ci doar prin filtrarea prin membrană.

Se pregătește un mediu de cultură prin adăugarea unui volum adecvat al soluțiilor stoc 1-4 în apă:

Se adaugă în 500 ml de apă sterilizată:

10 ml de soluție stoc nr. 1

1 ml de soluție stoc nr. 2

1 ml de soluție stoc nr. 3

1 ml de soluție stoc nr. 4

Se completează până la 1 000 ml cu apă sterilizată.

Se lasă suficient timp pentru echilibrarea mediului cu CO_2 atmosferic, prin barbotare timp de câteva ore cu aer steril filtrat, dacă este necesar.

Pregătirea mediului EPA SUA

1. Se adaugă 1 ml din fiecare soluție stoc în *2.1–2.7* la aproximativ 900 ml de apă deionizată sau distilată, apoi se diluează la 1 l.

2. Soluțiile stoc de macronutrienți se obține prin dizolvarea următoarelor substanțe în 500 ml de apă deionizată sau distilată. Reactivii *2.1, 2.2, 2.3,* și *2.4* pot fi combinați într-o singură soluție stoc.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g.
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g.
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g.
2.4	Soluție stoc de macronutrienți (a se vedea punctul 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g.
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	A se vedea nota 1.

▼**M6**

Nota 1: Se folosește exclusiv pentru speciile de diatomee folosite pentru testare. Se poate adăuga direct (202,4 mg) sau prin soluția stoc, pentru a rezulta 20 mg/l Si concentrație finală în mediu.

3. Soluția stoc de micronutrienți se obține prin dizolvarea următoarelor substanțe în 500 ml de apă deionizată sau distilată:

3.1	H_3BO_3	92,760 mg.	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg.	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg.	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg.	
3.5	CoCl2·6H2O	0,714 mg.	
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg.	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg.	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg.	[(etilendinitrilo)tetraacetat disodiu].
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg	A se vedea nota 2.

Nota 2: Se folosește exclusiv pentru culturile stoc ale speciilor de diatomee.

4. Se ajustează pH-ul la 7,5± 0,1 cu 0,1 *N* sau 1,0 *N* NaOH sau HCl.

5. Se filtrează mediul într-un recipient steril printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm, dacă se folosește un contor de particule, sau printr-un filtru de 0,45 μm, dacă nu se folosește un contor de particule.

6. Mediul se depozitează la întuneric la aproximativ 4 °C până la utilizare.

▼M6

Apendicele 4

Exemplu de procedură pentru cultura de alge

Observații generale

Scopul cultivării pe baza procedurii de mai jos este acela de a obține culturi de alge pentru testele de toxicitate.

Trebuie folosite metode adecvate pentru a garanta lipsa infectării cu bacterii a culturilor de alge. Se recomandă culturile axenice, dar se stabilesc și se folosesc culturile cu un singur tip de alge.

Toate operațiile se efectuează în condiții sterile pentru a evita contaminarea cu bacterii și alte alge.

Echipamente și materiale

A se vedea metoda de testare: „Aparatură”.

Proceduri pentru obținerea culturilor de alge

Prepararea soluțiilor nutritive (mediilor):

Toate sărurile nutritive ale mediului se prepară ca soluții stoc concentrate și se păstrează la rece și întuneric. Aceste soluții se sterilizează prin filtrare sau în autoclavă.

Mediul se prepară prin adăugarea cantității corecte de soluție stoc în apa distilată sterilă, acordându-se atenție prevenirii infecțiilor. Pentru mediul solid se adaugă 0,8 % agar.

Cultura stoc:

Culturile stoc sunt culturi mici de alge care se transferă cu regularitate într-un mediu proaspăt pentru a acționa ca material inițial de testare. Dacă nu sunt folosite cu regularitate, se scurg pe tuburile înclinate acoperite cu agar. Culturile se transferă într-un mediu proaspăt cel puțin o dată la două luni.

Culturile stoc se cresc în flacoane conice care conțin mediul corespunzător (volum de cca 100 ml). Când algele sunt incubate la 20 °C cu iluminare continuă, este necesar un transfer săptămânal.

În timpul transferului, o cantitate din cultura „veche” se transferă cu pipete sterile într-un flacon cu mediu proaspăt, astfel încât, în cazul speciilor cu creștere rapidă, concentrația inițială să fie de cca 100 de ori mai mică decât în cultura veche.

Viteza de creștere a unei specii se poate determina din curba de creștere. Dacă aceasta se cunoaște, este posibil să se estimeze densitatea la care cultura ar trebui transferată într-un mediu nou. Acest lucru trebuie făcut înainte ca algele din cultură să atingă faza morții.

Precultura:

Precultura are ca scop obținerea unei cantități de alge adecvate pentru inocularea culturilor de testare. Precultura se incubează în condițiile testării și se folosește în timpul creșterii exponențiale, în mod normal după o perioadă de incubare de 2-4 zile. Când culturile de alge conțin celule deformate sau anormale, acestea trebuie înlăturate.

▼M6

Apendicele 5

Analiza datelor prin metoda regresiei neliniare

Considerații generale

Răspunsul la testele pe alge și alte teste de creștere microbiană – în mod natural, creșterea biomasei este o variabilă continuă sau metrică – o viteză de proces, dacă se folosește viteza de creștere, și integrala sa în funcție de timp, dacă se selectează biomasa. Ambele fac trimitere la răspunsul mediu corespunzător al probelor de control duplicat neexpuse care manifestă un răspuns maxim pentru condițiile impuse – lumina și temperatura fiind principalii factori determinanți în testul pe alge. Sistemul este distribuit sau omogen, iar biomasa poate fi considerată ca fiind un continuum fără a se ține cont de celulele individuale. Distribuția variantei tipului de răspuns pentru un astfel de sistem are legătură exclusiv cu factorii experimentali (descriși în mod obișnuit de distribuțiile log-normale sau normale ale erorilor). Aceasta este în contrast cu răspunsurile tipice din cadrul biotestului cu date binare, pentru care toleranța (distribuită de obicei binomial) a organismelor individuale este adesea presupusă a fi componenta dominantă a variantei. Răspunsurile de control sunt, în acest caz, zero sau nivel de fond.

În situația necomplicată, răspunsul normalizat sau relativ, r, descreşte uniform de la 1 (inhibare zero) la 0 (100 % inhibare). Este de reținut faptul că toate răspunsurile au o marjă de eroare aferentă și că inhibările aparent negative pot fi calculate doar ca rezultat al unei erori aleatorii.

Analiza regresiei

Modele

Obiectivul unei analize a regresiei este de a descrie cantitativ curba concentrație-răspuns sub forma unei funcții matematice de regresie $Y = f(C)$ sau, mai frecvent, $F(Z)$, unde $Z = \log C$. Folosită invers, $C = f^{-1}(Y)$ permite calcularea valorilor EC_x, inclusiv EC_{50}, EC_{10} și EC_{20} și limitele lor de încredere de 95 %. Câteva formule funcționale matematice simple au demonstrat că pot descrie cu succes relațiile concentrație-răspuns obținute în testele de inhibare a creșterii algelor. Funcțiile includ, de exemplu, ecuația logistică, ecuația Weibull nesimetrică și funcția de distribuție log-normală, toate acestea fiind curbe sigmoide care se apropie asimptotic de 0 pentru $C \rightarrow 0$ și de 1 pentru $C \rightarrow$ infinit.

Folosirea modelelor funcției-limită continue (de exemplu modelul Kooijman „de inhibare a creșterii populațiilor”, Kooijman et al. 1996) este o alternativă propusă recent la modelele asimptotice. Acest model nu presupune efecte la concentrații sub o anumită limită EC_0 +, care se estimează prin extrapolarea relației concentrație-răspuns pentru a intersecta axa concentrației prin folosirea unei funcții continue simple care nu este diferențiabilă în punctul de pornire.

Trebuie reținut că analiza poate consta într-o simplă minimizare a sumelor pătratelor reziduale (presupunând că varianța este constantă) sau a pătratelor ponderate, dacă eterogenitatea variantei este compensată.

Procedura

Procedura poate fi descrisă după cum urmează: se selectează o ecuație funcțională adecvată $Y = f(C)$ și se ajustează la date prin regresie neliniară. Se preferă folosirea măsurătorilor pentru fiecare flacon individual, și nu valorile medii ale probelor duplicat, pentru a se obține din date cât mai multe informații

▼M6

posibil. Dacă, pe de altă parte, varianța este mare, experiența practică arată că valorile medii ale probelor duplicat pot asigura o estimare matematică mai precisă, mai puțin influențată de erorile sistematice ale datelor decât în cazul fiecărui punct de date reținut.

Se reprezintă grafic curba ajustată și datele măsurate și se examinează dacă ajustarea curbei este adecvată. Analiza valorilor reziduale poate fi un instrument deosebit de util în acest scop. Dacă relația funcțională aleasă pentru ajustarea relației concentrație-răspuns nu descrie în mod corect întreaga curbă sau o parte esențială a acesteia, cum ar fi răspunsul la concentrații scăzute, se alege altă opțiune de ajustare a curbei – de exemplu, o curbă asimetrică, cum ar fi funcția Weibull, în locul uneia simetrice. Inhibările negative pot fi o problemă pentru funcția de distribuție log-normală, de exemplu, fiind necesară și în acest caz o funcție de regresie alternativă. Nu se recomandă atribuirea valorii zero sau a unei valori pozitive mici unor astfel de valori negative, deoarece aceasta distorsionează distribuția erorilor. În scopul estimării valorilor $EC_{x\ scăzut}$, se poate dovedi utilă trasarea de ajustări separate ale curbei pe părți ale acesteia, cum ar fi partea de inhibare scăzută. Se calculează pe baza ecuației ajustate [prin „estimare inversă”, $C = f^{-1}(Y)$] estimările punctuale caracteristice ale EC_x și se raportează EC_{50} ca minim și una sau două estimări $EC_{x\ scăzut}$. Experiența dobândită în urma testării practice a arătat că precizia testului pe alge permite, în mod normal, o estimare suficient de precisă la un nivel de inhibare de 10 %, dacă punctele de date sunt suficiente – cu excepția situațiilor când stimularea are loc la concentrații scăzute, ca factor de confuzie. Precizia unei estimări a EC_{20} este adesea considerabil mai bună decât cea a unui EC_{10}, deoarece EC_{20} este poziționat de obicei pe partea aproximativ liniară a curbei concentrație-răspuns centrale. Uneori, EC_{10} poate fi dificil de interpretat ca urmare a stimulării creșterii. Astfel, chiar dacă EC_{10} poate fi obținut, în mod normal, cu suficientă precizie, se recomandă să se raporteze întotdeauna și EC_{20}.

Factori de ponderare

Varianța experimentală nu este în general constantă și include de obicei o componentă proporțională, aplicarea unei regresii ponderate permanente fiind, prin urmare, avantajoasă. Factorii de ponderare pentru o astfel de analiză sunt dați de obicei invers proporțional cu varianța:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Multe programe de regresie includ opțiunea de analiză de regresie ponderată, factorii de ponderare fiind enumerați într-un tabel. Pentru simplificare, factorii de ponderare se normalizează prin multiplicarea lor cu $n/\Sigma\ w_i$ (n este numărul punctelor de date), astfel încât suma lor să fie egală cu 1.

Răspunsuri de normalizare

Normalizarea prin răspunsul mediu de control ridică unele probleme de principiu și determină apariția unei structuri a variației destul de complicate. La împărțirea răspunsurilor la răspunsul mediu de control, în scopul obținerii procentajului de inhibare, se introduce o eroare suplimentară cauzată de eroarea pentru media de control. Cu excepția cazului în care această eroare este neglijabilă, factorii de ponderare din regresie și limitele de încredere se corectează pentru covarianța cu proba de control (Draper și Smith, 1981). Este de reținut faptul că precizia înaltă pe răspunsul mediu de control estimat este importantă pentru minimizarea variației generale pentru răspunsul relativ. Această varianță este descrisă mai jos:

(Indicele i se referă la nivelul concentrației i, iar indicele 0 se referă la probele de control.)

$$Yi = \text{Răspuns relativ} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

cu o varianță $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi\ /\ \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

și întrucât $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_i) = 1/r_0$ și $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

cu date distribuite normal și probe duplicat m_i și m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

varianța totală a răspunsului relativ Y_i devine astfel:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Eroarea pe media de control este invers proporțională cu rădăcina pătrată a numărului de probe de control duplicate exprimat ca medie, uneori fiind justificată introducerea de date anterioare în scopul reducerii considerabile în acest fel a erorii. O procedură alternativă este de a nu normaliza datele și de a ajusta răspunsurile absolute, inclusiv datele despre răspunsul de control, introducând însă valoarea răspunsului de control ca parametru adițional care urmează să fie ajustat prin regresie neliniară. Cu o ecuație obișnuită de regresie cu 2 parametri, această metodă impune ajustarea a 3 parametri, necesitând prin urmare mai multe puncte de date decât regresia neliniară pe date care sunt normalizate prin folosirea unui răspuns de control prestabilit.

Intervale de încredere inverse

Calcularea intervalelor de încredere ale regresiei neliniare prin estimare inversă este destul de complexă, nefiind inclusă ca dotare standard în pachetele de programe informatice uzuale de statistică. Limitele de încredere aproximative pot fi obținute cu ajutorul programelor standard de regresie neliniară cu reparametrizare (Bruce și Versteeg, 1992), care presupune rescrierea ecuației matematice cu estimările punctuale dorite, de exemplu EC_{10} și EC_{50} ca parametri de estimat. (Fie funcția I = f (α, β, concentrație) și se folosesc relațiile de definiție f (α, β, EC_{10}) = 0,1 și f (α, β, EC_{50}) = 0,5 pentru a substitui f (α, β, concentrație) cu o funcție echivalentă g (EC_{10}, EC_{50}, concentrație).

Un calcul mai direct (Andersen et al., 1998) se efectuează prin reținerea ecuației originale și folosirea unei expansiuni Taylor în jurul mediilor r_i și r_0.

În ultimul timp au devenit populare „metodele bootstrap”. Aceste metode folosesc datele măsurate și reeșantionarea frecventă cu ajutorul unui generator de numere aleatorii pentru a estima o distribuție empirică a variantei.

BIBLIOGRAFIE

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. și Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. **DETERMINAREA BIODEGRADABILITĂȚII „RAPIDE”**

PARTEA I. **CONSIDERAȚII GENERALE**

I.1. INTRODUCERE

Sunt descrise șase metode de testare care permit trierea substanțelor chimice pentru biodegradabilitate rapidă în mediul apos aerob:

(a) Epuizarea Carbonului Organic Dizolvat (COD) (Metoda C.4-A)

(b) Test de screening OCDE – Epuizarea COD (Metoda C.4-B)

(c) Degajarea bioxidului de carbon (CO_2) (Testul modificat Sturm) (Metoda C.4-C)

(d) Respirometrie manometrică (Metoda C.4-D)

(e) Vas închis (Metoda C.4-E)

(f) MITI (Ministerul Comerțului și Industriei Internaționale – Japonia) (Metoda C.4-F)

Considerațiile generale și comune privind cele șase teste sunt prezentate în partea I a metodei. Aspectele specifice metodelor individuale sunt prezentate în părțile II-VII. Apendicele conțin definiții, formule și material orientativ.

Un test interlaboratoare OCDE, efectuat în 1988 ca exercițiu de comparabilitate, a arătat că metodele dau rezultate compatibile. Cu toate acestea, în funcție de caracteristicile fizice ale substanței ce urmează a fi testată, poate fi preferată o metodă sau alta.

I.2. ALEGEREA METODEI ADECVATE

Pentru a alege cea mai adecvată metodă, sunt necesare informații legate de solubilitatea substanței chimice, presiunea de vapori și caracteristicile de adsorbție. Structura sau formula chimică trebuie cunoscute pentru a calcula valorile teoretice și/sau a verifica valorile determinate ale parametrilor, de exemplu, CTO, CO_2T, COD, COT, CCO (a se vedea apendicele 1 și 2).

Substanțele de testat care sunt solubile în apă până la cel puțin 100 mg/l pot fi evaluate prin toate metodele, cu condiția ca ele să fie nevolatile și neadsorbante. Pentru substanțele chimice care sunt greu solubile în apă, volatile sau adsorbante, metodele adecvate sunt indicate în tabelul 1 și descrise în apendicele 3. Substanțele chimice cu volatilitate moderată pot fi testate prin metoda epuizării COD, dacă există destul spațiu pentru gaz în vasele de testare (care trebuie să aibă dopuri adecvate). În acest caz, se pregătește și un martor abiotic care să permită urmărirea pierderilor de masă.

▼B

Tabelul 1

Aplicabilitatea metodelor de testare

Test	Metoda analitică	Adecvare la substanțele care sunt:		
		greu solubile	volatile	adsorbante
Epuizare COD	Carbon organic dizolvat	—	—	+/–
Epuizare OCDE modificată	Carbon organic dizolvat	—	—	+/–
Degajarea CO_2	Respirometrie: degajarea CO_2	+	—	+
Respirometrie manometrică	Respirometrie manometrică: consum de oxigen	+	+/–	+
Vas închis	Respirometrie: oxigen dizolvat	+/–	+	+
MITI	Respirometrie: consum de oxigen	+	+/–	+

Sunt necesare informații legate de puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale compusului de testat pentru a interpreta rezultatele obținute, în special când rezultatele au valori mici sau marginale.

Informațiile legate de toxicitatea substanței față de bacterii (apendicele 4) sunt foarte folositoare pentru alegerea concentrațiilor și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor scăzute de biodegradare.

I.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Pentru a verifica metoda, se testează substanțe de referință care îndeplinesc criteriile de biodegradabilitate rapidă într-un flacon adecvat în paralel cu testele propriu-zise.

Substanțele chimice adecvate sunt anilina (proaspăt distilată), acetatul de sodiu și benzoatul de sodiu. Toate aceste substanțe chimice de referință se degradează în condițiile de lucru din prezentele metode, chiar și când nu se adaugă deliberat inocul.

S-a sugerat faptul că trebuie găsită o substanță chimică de referință ușor degradabilă, dar care să necesite adăugarea unui inocul. S-a propus ftalatul acid de potasiu, însă este nevoie de obținerea mai multor dovezi în cazul acestei substanțe înainte ca ea să fie acceptată ca substanță de referință.

La testele de respirometrie, compușii care conțin azot pot afecta consumul de oxigen din cauza nitrificării (a se vedea apendicele 2 și 5).

I.4. PRINCIPIUL METODELOR DE TESTARE

O soluție sau suspensie a substanței de testat în mediu mineral este inoculată și incubată în condiții aerobe la întuneric sau lumină difuză. Cantitatea de COD datorată inoculului în soluție trebuie să fie menținută la valori cât mai mici posibile în comparație cu cantitatea de COD datorată substanței de testat. Activitatea endogenă a inoculului este cuantificată făcând teste martor paralele, cu inocul și fără substanță de testat, deși activitatea endogenă a celulelor în prezența substanței nu se suprapune exact peste activitatea endogenă a martorului. În paralel se testează o substanță de referință pentru a controla funcționarea modului de operare.

▼B

În general, degradarea este urmată de determinarea parametrilor, cum ar fi COD, generarea de CO_2 și consumul de oxigen, iar măsurătorile se fac la intervale destul de scurte, pentru a permite identificarea momentului de începere și terminare a biodegradării. Cu respirometre automate măsurarea se efectuează continuu. COD se măsoară uneori alături de un alt parametru, dar acest lucru se face în mod obișnuit numai la începutul și sfârșitul testării. De asemenea, se poate folosi o analiză chimică specifică pentru a estima degradarea primară a substanței de testat și pentru a se determina concentrația substanțelor intermediare formate (obligatoriu în testul MITI).

În mod normal, testul durează 28 zile. Cu toate acestea, testele se pot încheia înainte de 28 zile, adică de îndată ce curba biodegradării se aplatizează pentru cel puțin 3 determinări. Testele se pot, de asemenea, prelungi peste 28 zile, când curba arată că biodegradarea a început, dar că nu s-a ajuns la aplatizare în a 28-a zi.

I.5. CRITERII DE CALITATE

I.5.1. **Reproductibilitate**

Dată fiind natura biodegradării și a culturilor bacteriene mixte folosite ca inoculi, determinările se fac cel puțin în duplicat.

S-a observat experimental că la o concentrație mai mare de microorganisme adăugate inițial în mediul de testare variațiile între replici sunt mai mici. Testele interlaboratoare au arătat, de asemenea, că pot exista mari variații între rezultatele obținute de diferite laboratoare, dar că se poate ajunge la o armonizare acceptabilă în cazul compușilor ușor biodegradabili.

I.5.2. **Validitatea testului**

Testul se consideră validat dacă diferența dintre valorile extreme reprezentând gradul de îndepărtare al substanței la momentul aplatizării curbelor de biodegradare ale replicilor este mai mică de 20 % fie la sfârșitul testului, fie la începutul ferestrei de 10 zile, după caz, și dacă procentul de degradare a substanței de referință a atins nivelul de biodegradabilitate rapidă în 14 zile. Dacă nu este întrunită niciuna din aceste condiții, testul se repetă. Dată fiind rigoarea metodelor, valorile scăzute nu înseamnă în mod necesar că substanța de testat nu este biodegradabilă în condiții de mediu, ci că sunt necesare alte studii pentru a determina biodegradabilitatea.

Dacă într-un test de toxicitate care conține atât substanța de testat, cât și o substanță chimică de referință are loc mai puțin de 35 % degradare (bazat pe COD) sau mai puțin de 25 % (bazat pe CTO sau CO_2T) în 14 zile, se poate presupune că substanța de testat este inhibitoare (a se vedea și apendicele 4). Seria de teste se repetă, dacă este posibil folosind o concentrație mai scăzută a substanței de testat și/sau o concentrație mai ridicată a inoculului, dar nu mai mult de 30 mg solide/litru.

I.6. MOD DE OPERARE GENERAL ȘI PREGĂTIRI

Condițiile generale aplicabile testelor sunt rezumate în tabelul 2. Aparatura și alte condiții de testare legate în mod specific de un anume test sunt descrise în subcapitolul destinat testului respectiv.

▼B

Tabelul 2

Condiții de testare

Test	Epuizare COD	Eliminare CO_2	Respirometrie manometrică	Test de screening OCDE	Vas închis	MITI (I)
Concentrația substanței de testat						
în mg/l			100		2-10	100
mg COD/l	10-40	10-20		10-40		
mg CTO/l			50-100		5-10	
Concentrația inoculului (în celule/l, aprox.)	≤ 30 mg/l SS sau ≤ 100 ml efluent/l (10^7-10^8)			0,5ml efluent secundar/l (10^5)	≤ 5 ml efluent/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Concentrația elementelor în mediu mineral (în mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					De preferință 7,0
temperatură	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

COD = carbon organic dizolvat CTO = cerere teoretică de oxigen SS = materii solide în suspensie

I.6.1. **Apa de diluție**

Se folosește apa deionizată sau distilată fără concentrații inhibitoare de substanțe toxice (de exemplu, ioni de Cu^{++}). Compusul de testat trebuie să nu contribuie cu mai mult de 10 % la conținutul de carbon organic al apei. Pentru a elimina valorile ridicate ale probei martor este necesar ca apa de testare să aibă o puritate ridicată. Contaminarea poate rezulta din impuritățile inerente și din rășinile schimbătoare de ioni și material provenit din liza de bacterii și alge. Pentru fiecare serie tratată se folosește numai o șarjă de apă, verificată înainte prin analiza COD. O astfel de verificare nu este necesară pentru testul în vas flacon închis, dar consumul de oxigen al apei trebuie să fie scăzut.

▼B

I.6.2. **Soluțiile mamă ale componentelor minerale**

Pentru a prepara soluțiile de testare se prepară soluțiile mamă ale componentelor minerale, cu concentrațiile adecvate. Se pot folosi următoarele soluții mamă (cu factori de diluție diferiți) pentru metodele: epuizare COD, test de screening modificat OCDE, eliminare CO_2, respirometrie manometrică, testul în vas închis.

Factorii de diluție și, pentru testul MITI, pregătirea specifică a mediului mineral, sunt prezentate în capitolele referitoare la testele respective.

Soluțiile mamă:

Se prepară următoarele soluții mamă folosind reactivi de puritate analitică:

(a)	ortofosfat diacid de potasiu, KH_2PO_4	8,50 g
	ortofosfat acid de potasiu, K_2HPO_4	21,75 g
	ortofosfat acid de sodiu dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	33,40 g
	clorură de amoniu, NH_4Cl	0,50 g
	Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru. pH-ul soluției este 7,4.	
(b)	clorură de calciu, anhidră, $CaCl_2$	27,50 g
	sau clorură de calciu dihidrat, $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	36,40 g
	Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru	
(c)	sulfat de magneziu heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.	
(d)	clorură ferică (III) hexahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.	

Notă: Pentru a evita prepararea acestei soluții imediat înainte de folosire, se adaugă o picătură de HCl concentrat sau 0,4 g sare disodică a acidului etilendiamin-tetraacetic (EDTA) pe litru.

I.6.3. **Soluții mamă ale substanțelor chimice**

De exemplu, 1-10 g de substanță de testat sau de referință se dizolvă în apă deionizată și se completează până la 1 litru, când solubilitatea depășește 1 g/l. În caz contrar, soluțiile mamă se prepară în mediu mineral sau se adaugă substanța de testat direct în mediul mineral. Pentru manevrarea substanțelor chimice mai puțin solubile, a se vedea apendicele 3, dar în testul MITI (Metoda C.4-F), nu se folosesc nici solvenți și nici agenți de emulsionare.

▼B

I.6.4. **Inocul**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: nămol activ, efluenți uzați (neclorinați), ape de suprafață și soluri sau dintr-un amestec al acestora. Pentru testele de epuizare COD, eliminarea CO_2 și respirometrie manometrică, dacă se folosește nămol activ, acesta se ia dintr-o instalație de tratare sau o instalație de laborator care primește predominant ape reziduale menajere. S-a constatat că inoculi din alte surse dau rezultate foarte difuze. Pentru testul de screening modificat OCDE și testul în vas închis, este nevoie de un inocul mai diluat, fără agregate floculate de nămol, iar sursa preferată este un efluent secundar dintr-o instalație industrială sau de laborator pentru tratarea apei reziduale menajere. În testele MITI inoculul provine dintr-un amestec de surse și este descris în capitolul testului respectiv.

I.6.4.1. *Inocul din nămoluri active*

Se prelevează o probă de nămol activ proaspăt din bazinul de aerare al unei instalații de tratare ape reziduale sau dintr-o instalație de laborator care tratează în special apele reziduale menajere. Se îndepărtează particulele grosiere dacă este necesar, prin filtrate printr-o sită fină, apoi nămolul se menține în condiții aerobe.

Ca alternativă, se lasă la decantat sau se centrifughează proba (de exemplu, la 1 100 rot./min timp de 10 minute) după îndepărtarea tuturor particulelor grosiere. Se îndepărtează stratul de supernatant. Nămolul se spală în mediu mineral. Se prepară o suspensie de nămol concentrat în mediu mineral pentru a obține o concentrație de 3-5 g solide în suspensie/l și se aerează până în momentul folosirii.

Nămolul este prelevat dintr-o instalație clasică, care funcționează corect. Dacă nămolul provine dintr-o instalație de tratare cu debit mare sau se presupune că ar conține inhibitori, trebuie spălat. După o amestecare puternică, se lasă la decantat sau se centrifughează nămolul din noua suspensie, apoi se îndepărtează supernatantul; nămolul spălat se trece din nou în suspensie într-un alt volum de mediu mineral. Se repetă această procedură până când se consideră că nămolul nu mai conține substrat sau inhibitori în exces.

Imediat înainte de folosire, se prelevează o probă după ce nămolul este suspensionat complet sau, după caz, din nămol netratat, pentru a determina greutatea uscată a solidelor în suspensie.

O altă alternativă de obținere a inoculului este de a omogeniza nămolul activ (3-5 g solide în suspensie/l) într-un amestecător mecanic două minute la viteză medie; se lasă apoi timp de 30 minute, sau mai mult dacă este nevoie, la decantat și se prelevează supernatantul pentru a fi folosit ca inocul într-un raport de 10 ml/l de mediu mineral.

I.6.4.2. *Alte surse de inocul*

Inoculul se poate obține din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care se alimentează mai ales cu apă uzată menajeră. Se prelevează o probă proaspătă de apă uzată; se transportă în condiții aerobe. Se lasă să se decanteze timp de o oră sau se filtrează prin hârtie de filtru cu porozitate mare. Se menține efluentul decantat sau filtrat în condiții aerobe până în momentul folosirii. Până la 100 ml din acest tip de inocul se poate folosi pe litru de mediu mineral.

▼B

O altă sursă de inocul este apa de suprafață. În acest caz, se prelevează o probă de apă de suprafață adecvată (de exemplu, râu, lac) și se menține în condiții aerobe până în momentul folosirii. Dacă este nevoie, inoculul se concentrează prin filtrare sau centrifugare.

I.6.5. **Precondiționarea inoculului**

Inoculul poate fi precondiționare și adus în condițiile de testare, dar nu și preadaptat la substanța de testat. Precondiționarea constă în aerarea nămolului activ în mediu mineral sau efluent secundar timp de 5-7 zile, la temperatura de testare. Această precondiționare îmbunătățește uneori precizia metodelor prin reducerea valorilor din probele martor. Nu se consideră necesară precondiționarea inoculului în cazul testului MITI.

I.6.6. **Martori abiotici**

Dacă este necesar, posibila degradare abiotică a substanței de testat se verifică prin determinarea îndepărtării COD, a consumului de oxigen sau a eliminării bioxidului de carbon în probe martor sterile, care nu conțin inocul. Se sterilizează prin filtrare cu membrană filtrantă (0,2 - 0,45 μm) sau prin adăugarea unei substanțe toxice adecvate într-o concentrație corespunzătoare. Dacă se folosește filtrarea prin membrană, se prelevează probe în mod aseptic, pentru a menține sterilitatea. Dacă nu s-a realizat înainte adsorbția substanței de testat, testele care măsoară biodegradarea ca îndepărtare a COD, în special cele care folosesc ca inocul nămolul activ, trebuie să includă un martor abiotic care este inoculat și otrăvit.

I.6.7. **Număr de vase**

Numărul de vase într-un experiment tipic este prezentat în capitolul aferent fiecărui test.

Se pot folosi următoarele tipuri de vase:

— Suspensie de testare: conține substanță de testat și inocul

— Proba martor cu inocul: conține numai inocul

— Martor de metodă: conține substanță de referință și inocul

— Martor steril abiotic: conține substanță de testat, steril (a se vedea punctul I.6.6)

— Martor de adsorbție: conține substanță de testat, inocul și agentul de sterilizare

— Martor de toxicitate: conține substanță de testat, substanță de referință și inocul

Este obligatoriu ca testul propriu-zis și testul martor cu inocul să se facă în paralel. Este de dorit să se facă determinări și în alte vase, în paralel.

Acest lucru s-ar putea totuși să nu fie posibil întotdeauna. Se asigură suficiente probe sau citiri pentru a permite evaluarea procentului de degradare a substanței într-o perioadă de 10 zile.

▼B

I.7. DATE ȘI EVALUARE

Pentru calcularea lui D_t, degradarea procentuală, se folosesc valorile medii ale măsurătorilor duplicate ale parametrilor determinați atât în testul propriu-zis, cât și în proba martor cu inocul. Formulele matematice pentru calcularea D_t sunt prezentate în capitolele de mai jos pentru fiecare test. Evoluția degradării este ilustrată grafic și se indică fereastra de 10 zile. Se calculează și se consemnează procentul de eliminare a substanței obținut la sfârșitul perioadei de 10 zile și valoarea corespunzătoare aplatizării curbei de biodegradare sau sfârșitului testului, după caz.

La testele respirometrice, compușii care conțin azot pot afecta consumul de oxigen din cauza nitrificării (a se vedea apendicele 2 și 5).

I.7.1. **Măsurarea degradării prin intermediul determinării COD**

Pentru a se putea evalua validitatea testului (a se vedea punctul I.5.2), se calculează D_t, degradarea procentuală, de fiecare dată când se prelevează o probă, și anume se calculează separat pentru vasele conținând substanța de testat folosind media valorilor din măsurătorile COD duplicate. Se calculează folosind următoarea ecuație:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

unde:

D_t = % degradare la timpul t

C_o = concentrația medie inițială a COD în mediul de cultură inoculat ce conține substanța de testat (mg COD/l)

C_t = concentrația medie a COD la timpul t în mediul de cultură inoculat ce conține substanța de testat (mg COD/l)

C_{bo} = concentrația medie inițială a COD în proba martor cu mediu mineral inoculat (mg COD/l)

C_{bt} = concentrația medie a COD la timpul t în proba martor cu mediu mineral inoculat (mg COD/l)

Toate concentrațiile se măsoară experimental.

I.7.2. **Măsurarea degradării prin intermediul analizei specifice**

Dacă sunt disponibile date analitice specifice, biodegradarea primară se calculează din:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

unde:

D_t = % degradare la un timp t, în mod normal 28 zile

S_a = cantitatea reziduală de substanță de testat în mediu inoculat, la sfârșitul testării (mg)

S_b = cantitatea reziduală de substanță de testat în proba martor, cu apă/mediu mineral, la care s-a adăugat numai substanța de testat (mg)

▼B

I.7.3. **Degradarea abiotică**

Dacă se folosește un martor steril, abiotic, degradarea abiotică se calculează în procente folosind formula:

$$\%\text{degradare abiotică} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

unde:

$C_{s(o)}$ = concentrația COD în martorul steril la ziua 0

$C_{s(t)}$ = concentrația COD în martorul steril în ziua t

I.8. RAPORT

Raportul de testare cuprinde, dacă este posibil, următoarele date:

— substanțele chimice de testat și de referință, precum și puritatea lor;

— condițiile de testare;

— inocul: natura, locul de prelevare, concentrația și eventuala precondiționare;

— proporția și natura deșeurilor industriale prezente în nămol, dacă se cunosc;

— durata și temperatura testului;

— în cazul substanțelor greu solubile, tratamentul aplicat;

— metoda de testare aplicată; pentru orice modificare a modului de operare trebuie prezentate argumentele științifice și explicația;

— fișa de date;

— orice fenomene de inhibiție observate;

— orice degradare abiotică observată;

— date analitice specifice, dacă sunt disponibile;

— date analitice referitoare la produsele intermediare, dacă există;

— graficul degradării, exprimat în procente în funcție de timp pentru substanțele de testat și de referință; faza de latență, faza de degradare, fereastra de 10 zile și panta sunt indicate clar (apendicele 1). Dacă testul satisface criteriile de validare, la trasarea graficului se poate folosi media procentelor de eliminare ale vaselor ce conțin substanța de testat;

— eliminarea procentuală după fereastra de 10 zile și cea corespunzătoare aplatizării curbei de biodegradare sau sfârșitului testului.

PARTEA II. **TESTUL DE EPUIZARE COD** (Metoda C.4-A)

II.1. PRINCIPIUL METODEI

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat care conține o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-40 mg COD/l) ca singura sursă nominală de carbon organic, se aerează la întuneric sau lumină difuză la 22 ± 2 °C.

▼B

Degradarea este urmată de analiza COD la intervale frecvente pe o perioadă de 28 de zile. Gradul de biodegradare se calculează exprimând concentrația COD îndepărtată (corectată în funcție de cea din proba martor cu inocul) ca procent din concentrația prezentă inițial. Gradul de biodegradare primară poate fi, de asemenea, calculat din analiza chimică suplimentară făcută la începutul și la sfârșitul incubării.

II.2. DESCRIEREA METODEI

II.2.1. **Aparatură**

(a) vase conice, de exemplu, 250 ml-2 litri în funcție de volumul necesar pentru analiza COD;

(b) agitatoare pentru vase conice, fie cu control automat al temperaturii, fie fără acest control, dar folosite într-o încăpere cu temperatură constantă și având putere suficientă pentru a menține condițiile aerobe în toate vasele;

(c) aparatură de filtrare cu membrane adecvate;

(d) analizor COD;

(e) oxigenometru;

(f) centrifugă.

II.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

II.2.3. **Prepararea și adaptarea inoculului**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: efluenți uzați, ape de suprafață, soluri sau dintr-un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

II.2.4. **Pregătirea vaselor**

De exemplu, se introduc 800 ml de mediu mineral în vase conice de 2 litri și se adaugă volume suficiente de soluții mamă ale substanțelor de testat și de referință în fiecare vas pentru a obține o concentrație a substanței chimice echivalentă cu 10-40 mg COD/l. Se verifică valorile pH și se reglează, după caz, la 7,4. Se inoculează vasele cu nămol activ sau cu o altă sursă de inocul (a se vedea punctul I.6.4), pentru a obține o concentrație finală nu mai mare de 30 mg solide în suspensie/l. De asemenea, se prepară probe martor de inocul în mediu mineral, dar fără substanță de testat sau de referință.

După caz, se folosește un vas pentru a verifica efectul inhibitor posibil al substanței de testat, inoculând o soluție în mediu mineral având concentrații comparabile ale substanței de testat și ale celei de referință.

De asemenea, dacă este necesar, se pregătește încă un vas, steril, pentru a verifica dacă substanța de testat este degradată abiotic, folosind o soluție neinoculată a substanței de testat (a se vedea punctul I.6.6).

▼B

Suplimentar, dacă se presupune că substanța de testat este adsorbită în mod semnificativ pe sticlă, nămol etc., se face o estimare preliminară pentru a determina gradul probabil de adsorbție și, astfel, adecvarea testului la substanța respectivă (a se vedea tabelul 1). Se folosește un vas ce conține substanță de testat, inocul și agent de sterilizare.

Se completează volumele în toate vasele până la 1 litru cu mediu mineral și, după amestecare, se ia o probă din fiecare vas pentru a determina concentrația inițială a COD (a se vedea apendicele 2 punctul 4). Se acoperă gura vaselor, de exemplu, cu folie de aluminiu, astfel încât să se permită schimbul liber de aer între vas și atmosfera înconjurătoare. Apoi acestea se montează la agitatoare pentru începerea testului.

II.2.5. **Numărul de vase într-o testare tipică**

Vasele 1 și 2: suspensia de testare

Vasele 3 și 4: proba martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de adsorbție

Vasul 8: martor de toxicitate

A se vedea și punctul I.6.7.

II.2.6. **Efectuarea testului**

Pe parcursul testului se determină concentrațiile COD în fiecare vas, în duplicat și la intervalele de timp cunoscute, suficient de frecvent pentru a putea determina începutul ferestrei de 10 zile și eliminarea procentuală la sfârșitul ferestrei de 10 zile. Se prelevează numai volumul minim de suspensie necesar pentru fiecare determinare.

Înainte de prelevarea probelor se completează pierderile cauzate de evaporare, adăugând apă de diluție (punctul 1.6.1) în cantitatea necesară, după caz. Se amestecă mediul de cultură foarte bine, verificând dacă materialul ce aderă pe pereții vaselor s-a dizolvat sau a trecut în suspensie. Se filtrează prin membrană sau se centrifughează proba (a se vedea apendicele 2 punctul 4), imediat după ce a fost prelevată. Probele filtrate sau centrifugate se analizează în aceeași zi sau se depozitează la 2-4 ^{o}C timp de maxim 48 de ore ori se mențin la temperaturi mai mici de – 18 ^{o}C pentru un timp mai îndelungat.

II.3. DATE ȘI RAPORT

II.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Se calculează degradarea în procente la timpul t conform punctului I.7.1 (determinare COD) și, opțional, punctului I.7.2. (analize specifice).

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date prevăzute.

▼B

II.3.2. **Validarea rezultatelor**

A se vedea punctul I.5.2.

II.3.3. **Raportul de testare**

A se vedea punctul I.8.

II.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

TEST DE EPUIZARE COD

1. **LABORATOR**

2. **DATA ÎNCEPERII TESTULUI**

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță

Concentrația inițială în mediul de testare, t_0: mg/l substanță

4. **INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația solidelor în suspensie în amestecul de reacție: mg/l

5. **DETERMINĂRI DE CARBON**

Analizor de carbon:

	Vas nr.		COD după n zile (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Substanță de testat + inocul	1	a_1					
		a_2					
		a, medie $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medie $C_{b(t)}$					

▼B

	Vas nr.		COD după n zile (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Probă martor cu inocul fără substanță de testat	3	c_1					
		c_2					
		c, medie $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medie $C_{d(t)}$					
	$C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUAREA DATELOR BRUTE**

Vas nr.		% degradare după n zile				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C - C_{b1(t)}}{C_{a(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C - C_{b1(t)}}{C_{b(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$	0				
Medie (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 și D_2 nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

Notă: formate similare se pot folosi pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate.

7. **MARTOR ABIOTIC** (Opțional)

	Timp (zile)	
	0	t
Conc. COD mg/l în martor steril	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\text{degradare abiotică} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. **ANALIZE CHIMICE SPECIFICE** (Opțional)

	Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l)	% degradare primară
Martor steril	S_b	

▼B

	Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l)	% degradare primară
Mediu de testare inoculat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTEA III. **TESTUL DE SCREENING MODIFICAT OCDE** (Metoda C.4-B)

III.1. PRINCIPIUL METODEI

Un volum măsurat de mediu mineral, cu o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-40 mg COD/l) ca singura sursă nominală de carbon organic, se inoculează cu 0,5 ml efluent/litru de mediu. Amestecul se aerează la întuneric sau lumină difuză la 22 °C ± 2 °C.

Degradarea este urmată de analiza COD la intervale frecvente într-o perioadă de 28 de zile. Gradul de biodegradare este calculat exprimând concentrația COD eliminată (corectată în funcție de cea din proba martor cu inocul) ca procent din concentrația inițială. Gradul de biodegradare primară poate fi de asemenea calculat din analiza chimică suplimentară făcută la începutul și sfârșitul incubării.

III.2. DESCRIEREA METODEI

III.2.1. **Aparatură**

(a) vase conice, de exemplu, de la 250 ml la 2 litri, în funcție de volumul necesar pentru analiza COD;

(b) agitatoare pentru vase conice, fie cu control automat al temperaturii, fie fără acest control, dar folosite într-o încăpere cu temperatură constantă și având putere suficientă pentru a menține condițiile aerobe în toate vasele;

(c) aparatură de filtrare cu membrane adecvate;

(d) analizor COD;

(e) oxigenometru;

(f) centrifugă.

III.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

Această metodă folosește numai 0,5 ml efluent/litru ca inocul și prin urmare mediul poate necesita adăugarea de microelemente și factori de creștere. Acest lucru se face prin adăugarea câte unui mililitru din fiecare din următoarele soluții/litru de mediu final:

▼B

Soluție cu microelemente:

Sulfat de mangan tetrahidrat, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Acid boric, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfat de zinc heptahidrat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolibdat de amoniu, $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelați de fier ($FeCl_3$ cu acid etilendiamin-tetraacetic)	100,0 mg

Se dizolvă și se aduce până la 1 000 ml cu apă de diluție

Soluție de vitamine:

Extract de drojdie	15,0 mg

Se dizolvă extractul de drojdie în 100 ml apă. Se sterilizează prin trecere printr-o membrană de 0,2 microni sau se pregătește proaspătă.

III.2.3. **Prepararea și precondiționarea inoculului**

Inoculul este obținut din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care folosește în special ape menajere (a se vedea punctele I.6.4.2 și I.6.5).

Se folosesc 0,5 ml/l de mediu mineral.

III.2.4. **Pregătirea vaselor**

De exemplu, se introduc câte 800 ml de mediu mineral în vase conice de 2 litri și se adaugă volume suficiente de soluții mamă ale substanțelor de testat și de referință, în vase separate, pentru a obține o concentrație a substanței echivalentă cu 10-40 mg COD/l. Se verifică valoarea pH-ului și se reglează, dacă este necesar, la 7,4. Se inoculează vasele cu 0,5 ml/l efluent de apă reziduală (a se vedea punctul I.6.4.2). De asemenea, se prepară probe de inocul pentru martor, în mediu mineral, fără substanță de testat sau de referință.

Dacă este necesar, se folosește un vas pentru a verifica posibilul efect inhibitor al substanței, inoculând o soluție în mediu mineral având concentrații comparabile ale substanței de testat și de referință.

De asemenea, dacă este necesar, se pregătește încă un vas, steril, pentru a se verifica dacă substanța de testat este degradată abiotic, folosind o soluție neinoculată a substanței de testat (a se vedea punctul I.6.6).

Suplimentar, dacă se presupune că substanța de testat este adsorbită în mod semnificativ pe sticlă, nămol etc., se face o estimare preliminară pentru a determina gradul probabil de adsorbție și, astfel, adecvarea testului la substanța respectivă (a se vedea tabelul 1). Se folosește un vas ce conține substanță de testat, inocul și agent de sterilizare.

Se completează volumele în toate vasele până la 1 litru cu mediu mineral și, după amestecare, se ia o probă din fiecare vas pentru a determina concentrația inițială a COD (a se vedea apendicele 2 punctul 4). Se acoperă gura vaselor, de exemplu, cu folie de aluminiu, astfel încât să se permită schimbul liber de aer între vas și atmosfera înconjurătoare. Apoi acestea se montează la agitatoare pentru începerea testului.

▼B

III.2.5. **Numărul de vase într-un test tipic**

Vasele 1 și 2: suspensia de testare

Vasele 3 și 4: probă martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de adsorbție

Vasul 8: martor de toxicitate

A se vedea și punctul I.6.7.

III.2.6. **Desfășurarea testului**

Pe parcursul testului se determină concentrațiile COD în fiecare vas, în duplicat și la intervalele de timp cunoscute, suficient de frecvent pentru a putea determina începutul ferestrei de 10 zile și eliminarea procentuală la sfârșitul ferestrei de 10 zile. Se prelevează numai volumul minim de suspensie necesar pentru fiecare determinare.

Înainte de prelevarea probelor se completează pierderile cauzate de evaporare, adăugând apă de diluție (punctul I.6.1) în cantitatea necesară, după caz. Se amestecă mediul de cultură foarte bine, verificând dacă materialul ce aderă pe pereții vaselor s-a dizolvat sau a trecut în suspensie. Se filtrează prin membrană sau se centrifughează proba (a se vedea apendicele 2 punctul 4), imediat după ce a fost prelevată. Probele filtrate sau centrifugate se analizează în aceeași zi sau se depozitează la 2-4 ^{o}C timp de maxim 48 de ore ori se mențin la temperaturi mai mici de – 18 ^{o}C pentru un timp mai îndelungat.

III.3. DATE ȘI RAPORT

III.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Se calculează degradarea în procente la timpul t conform punctului I.7.1 (determinare COD) și, opțional, punctului I.7.2 (analize specifice).

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date prevăzute.

III.3.2. **Validarea rezultatelor**

A se vedea punctul I.5.2.

III.3.3. **Raportul de testare**

A se vedea punctul I.8.

III.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

TEST DE SCREENING MODIFICAT OCDE

1. **LABORATOR**

2. **DATA ÎNCEPERII TESTULUI**

▼B

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță

Concentrația inițială în mediul de testare, t_0: mg/l substanță

4. **INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația materiilor în suspensie în amestecul de reacție: mg/l

5. DETERMINĂRI DE CARBON

Analizor de carbon:

	Vas nr.		COD după n zile (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Substanță de testat + inocul	1	a_1					
		a_2					
		a, medie $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medie $C_{b(t)}$					
Probă martor cu inocul fără substanță de testat	3	c_1					
		c_2					
		c, medie $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medie $C_{d(t)}$					
	$C_{b1(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUAREA DATELOR BRUTE**

Vas nr.		% degradare după n zile				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{b1(t)}}{C_{a(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Vas nr.		% degradare după n zile				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{b1(t)}}{C_{b(0)} - C_{b1(0)}}\right) \times 100$	0				
Medie (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 și D_2 nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

Notă: formate similare se pot folosi pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate.

7. **MARTOR ABIOTIC** (Opțional)

	Timp (zile)	
	0	t
Conc. COD (mg/l) în martor steril	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\%\text{degradare abiotică} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. **ANALIZE CHIMICE SPECIFICE** (Opțional)

	Cantitatea reziduală a substanței de testat la sfârșitul testului (mg/l)	% degradare primară
Martor steril	S_b	
Mediu de testare inoculat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTEA IV. TESTUL DE DEGAJARE A CO_2 (Metoda C.4-C)

IV.1. PRINCIPIUL METODEI

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat, cu o concentrație cunoscută de substanță de testat (10-20 mg COD sau TOC/l) ca unică sursă nominală de carbon organic, se aerează prin trecerea aerului fără dioxid de carbon, cu debit controlat, la întuneric sau la lumină difuză. Degradarea este urmărită timp de 28 zile prin determinarea dioxidului de carbon produs, care este absorbit pe hidroxid de bariu sau de sodiu și este măsurat prin titrarea hidroxidului rămas sau drept carbon anorganic. Cantitatea de dioxid de carbon produs de substanța de testat (corectată cu cea rezultată din proba martor cu inocul) este exprimată ca procent din CO_2T. Gradul de biodegradare se poate de asemenea calcula din analizele COD suplimentare, făcute la începutul și la sfârșitul incubării.

▼B

IV.2. DESCRIEREA METODEI

IV.2.1. **Aparatură**

(a) vase de 2-5 litri, fiecare prevăzut cu un tub de aerare cu un capăt ajungând aproape de baza vasului și cu celălalt ieșind din vas;

(b) agitatoare magnetice, când se testează substanțe puțin solubile;

(c) vase pentru absorbția gazului;

(d) dispozitiv pentru controlul și măsurarea debitului de aer;

(e) aparatură pentru absorbția dioxidului de carbon, pentru prepararea aerului care nu conține dioxid de carbon; ca alternativă, se poate folosi un amestec de oxigen fără CO_2 și azot fără CO_2, din butelie, în proporția corectă (20 % O_2: 80 % N_2);

(f) dispozitiv pentru determinarea dioxidului de carbon, fie prin titrimetrie, fie printr-una din analizele cantitative ale carbonului anorganic;

(g) dispozitiv de filtrare cu membrană (opțional);

(h) analizor de COD (opțional).

IV.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la un 1 litru cu apă de diluție.

IV.2.3. **Prepararea și precondiționarea inoculului**

Inoculul poate proveni dintr-o varietate de surse: nămol activ, efluenți menajeri, ape de suprafață, soluri sau un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

IV.2.4. **Pregătirea vaselor**

Ca exemplu, următoarele volume și cantități sunt indicate pentru vase de 5 litri ce conțin 3 l de suspensie. Dacă se folosesc volume mai mici, valorile se modifică în consecință, dar se asigură precizia măsurării dioxidului de carbon format.

În fiecare vas de 5 litri se introduc 2 400 ml mediu mineral. Se adaugă un volum adecvat de nămol activ preparat (a se vedea punctele I.6.4.1 și I.6.5) pentru a rezulta o concentrație de solide în suspensie de cel mult 30 mg/l în 3 l de amestec inoculat. Ca alternativă, mai întâi se diluează nămolul preparat pentru a rezulta o suspensie de 500-1 000 mg/l în mediu mineral, înainte de adăugarea unei cantități alicote la conținutul vasului de 5 litri astfel încât să se obțină o concentrație de 30 mg/l; astfel se asigură o precizie mai mare. Pot fi folosite alte surse de inocul (a se vedea punctul I.6.4.2).

Acest amestec inoculat se aerează peste noapte, cu aer fără CO_2, pentru a elimina dioxidul de carbon din sistem.

▼B

Se adaugă volume cunoscute din soluțiile mamă ale materialului de testat și ale substanței de referință, separat, în vase de testare replicate, astfel încât concentrațiile de COD sau de COT provenite din substanțele adăugate să fie cuprinse între 10 și 20 mg/l; se lasă câteva vase fără adăugare de substanță de testat, fiind folosite drept martori pentru inocul. Substanțele de testat puțin solubile se adaugă direct în vas în funcție de greutate sau volum sau sunt tratate conform descrierii din apendicele 3.

Dacă este necesar, un vas se folosește pentru a verifica posibilul efect inhibitor al substanței de testat, prin adăugarea atât a substanței respective, cât și a substanței de referință, în aceleași concentrații ca și cele prezente în alte vase.

De asemenea, dacă este necesar, se folosește un vas steril pentru a verifica dacă substanța de testat este degradată abiotic, prin folosirea unei soluții neinoculate de substanță (a se vedea punctul I.6.6). Se sterilizează prin adăugarea unei substanțe toxice în concentrație adecvată.

Se aduc volumele de suspensii din toate vasele la 3 litri, prin adăugarea de mediu mineral înainte de aerare cu aer fără CO_2. Opțional, pot fi luate probe pentru analiza COD (a se vedea apendicele 2 punctul 4) și/sau pentru analize specifice. Se conectează vasele de absorbție la aerisirile vaselor.

Dacă se folosește hidroxid de bariu, se conectează trei vase de absorbție, fiecare conținând 100 ml de soluție de hidroxid de bariu 0,0125 M, în serie cu fiecare dintre vasele de 5 litri. Soluția trebuie să nu conțină sulfat și carbonat precipitat, iar concentrația sa se determină imediat înainte de utilizare. Dacă se folosește hidroxid de sodiu, se conectează două vase în paralel, cel de-al doilea acționând ca martor pentru a demonstra că tot dioxidul de carbon a fost absorbit în primul. Sunt adecvate vase de absorbție cu sistemul de închidere al flacoanelor pentru ser. Se adaugă 200 ml de hidroxid de sodiu 0,05 M la fiecare vas, ceea ce este suficient pentru a absorbi cantitatea totală de dioxid de carbon degajată, când substanța de testat este complet degradată. Soluția de hidroxid de sodiu, chiar când este proaspăt preparată, conține urme de carbonați; aceasta este corectată prin deducerea carbonatului din proba martor.

IV.2.5. **Numărul de vase pentru o testare tipică**

Vasele 1 și 2: suspensie de testare

Vasele 3 și 4: probă martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril abiotic

Vasul 7: martor de toxicitate

A se vedea, de asemenea, punctul I.6.7.

IV.2.6. **Desfășurarea testului**

Testul începe cu barbotarea aerului fără CO_2 prin suspensie la o viteză de 30-100 ml/min. Se prelevează periodic probe din absorbantul dioxidului de carbon, pentru analizarea conținutului de CO_2. În timpul primelor zece zile este recomandat ca analizele să fie făcute în fiecare a doua sau a treia zi și apoi în fiecare a 5-a zi până la a 28-a zi, astfel încât perioada ferestrei de 10 zile să poată fi identificată.

▼B

În a 28-zi se prelevează probe (opțional) pentru determinarea COD și/sau analize specifice, se măsoară pH-ul suspensiei și se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat la fiecare vas; se aerează vasele peste noapte pentru a elimina dioxidul de carbon prezent în suspensii. În ziua a 29-a se face ultima analiză a dioxidului de carbon degajat.

În zilele în care se determină CO_2, se deconectează vasul de absorbție cu hidroxid de bariu cel mai apropiat de vas și se titrează soluția de hidroxid cu HCl 0,05 M, folosind fenolftaleină ca indicator. Se mută vasele de absorbție rămase cu un loc mai aproape de vas și se adaugă un nou vas ce conține 100 ml hidroxid de bariu proaspăt 0,0125 M, ultimul în serie. Se fac titrări când e necesar, de exemplu când se observă un precipitat substanțial în primul vas de absorbție și înainte ca în cel de-al doilea să se observe ceva, sau cel puțin săptămânal. Ca alternativă, când se folosește NaOH ca absorbant, se ia cu o seringă o probă (depinzând de caracteristicile analizorului de carbon folosit) de soluție de hidroxid de sodiu din vasul de absorbție mai apropiat de vasul de testare. Se injectează proba în partea anorganică (CA) a analizorului de carbon pentru analiza directă a dioxidului de carbon degajat.

Se analizează conținutul celui de-al doilea vas de absorbție numai la sfârșitul testului, pentru a face corecția datelor în cazul în care dioxidul de carbon a pătruns și în acest vas.

IV.3. DATE ȘI RAPORT

IV.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Cantitatea de CO_2 captată de absorbant și titrată este dată de formula:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

unde:

V = volumul de HCl folosit pentru titrarea a 100 ml de absorbant (ml)

C_B = concentrația soluției de hidroxid de bariu (M)

C_A = concentrația soluției de acid clorhidric (M)

dacă C_B este 0,0125 M, iar C_A este 0,05 M, 100 ml hidroxid de bariu se titrează cu 50 ml, iar cantitatea de CO_2 este dată de formula:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrat} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Astfel, în acest caz, pentru a converti volumul de HCl titrat în mg CO_2 produs, factorul este 1,1.

Se calculează cantitățile de CO_2 produs de inocul în sine și de inocul plus substanța de testat, folosind respectivele valori de titrare, diferența fiind cantitatea de CO_2 produsă numai de substanța de testat.

De exemplu, dacă martorul cu inocul se titrează cu 48 ml și proba conținând inocul plus substanța de testat cu 45 ml,

$$CO_2 \text{ de la inocul} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 de la inocul plus substanța de testat = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg

Astfel, cantitatea de CO_2 produsă de substanța de testat este de 3,3 mg.

Procentul de biodegradabilitate se calculează din formula:

$$\%\text{degradare} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produs} \times 100}{CO_2\text{T} \times \text{mg substanța de testare adăugată}}$$

sau

$$\%\text{degradare} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ produs} \times 100}{\text{mg COT adăugat în test} \times 3{,}67}$$

3,67 fiind factorul de conversie (44/12) de la carbon la dioxid de carbon.

Se calculează degradarea procentuală în orice moment ca sumă a procentelor teoretice de eliminare a CO_2 (CO_2T) calculate pentru fiecare din zilele în care eliminarea CO_2 a fost măsurată.

Pentru vasele de absorbție cu hidroxid de sodiu se calculează cantitatea de dioxid de carbon produs, exprimat ca CI (mg), prin înmulțirea concentrației de CI în absorbant cu volumul de absorbant.

Se calculează procentul de degradare din:

$$\%\ \text{COT} = \frac{\text{mg CI din vasul de test} - \text{mg CI din blanc}}{\text{mg COT mg adăugat ca substanță de test}} \times 100$$

Se calculează COD eliminat (opțional) conform descrierii de la punctul I.7. Se înregistrează aceste rezultate și toate celelalte rezultate pe fișele de date prevăzute.

IV.3.2. **Validarea rezultatelor**

Conținutul de CI al suspensiei de substanță în mediul mineral la începutul testului trebuie să fie mai mic decât 5 % din CT, iar CO_2 total din martorul cu inocul, la sfârșitul testului, nu va depăși în mod normal media de 40 mg/l. Dacă se obțin valori mai mari de 70 mg CO_2/litru, datele și tehnica experimentală vor fi supuse unui examen critic.

A se vedea, de asemenea, I.5.2.

IV.3.3. **Raportul de testare**

A se vedea I.8.

IV.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat în continuare.

TEST DE DEGAJARE A DIOXIDULUI DE CARBON

1. **LABORATOR**

2. **DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI**

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/litru substanță

▼B

Concentrația inițială în mediu: mg/litru substanță

C total adăugat în vas: mg C

CO_2T: mg CO_2

4. **INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația de solide în suspensie în amestecul de reacție: mg/litru

5. **PRODUCEREA DIOXIDULUI DE CARBON ȘI DEGRADABILITATEA**

Metodă: $Ba(OH)_2$/NaOH/altele

Timpul	CO_2 format Test (mg)		CO_2 format Probă martor (mg)		CO_2 cumulat (mg) (media test minus proba martor)		$\frac{CO_2 cumulat}{CO_2T} \times 100$		
	1 / 2	media	3 / 4	media	1	2	1	2	media
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Notă: Pentru substanțele de referință și pentru martorii de toxicitate pot fi folosite formate similare.

6. **ANALIZA CARBONULUI** (opțional)

Analizor de carbon:

Timpul (ziua)	Proba martor mg/l	Substanța de testat mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) sau la sfârșitul incubării.

▼B

$$\% \text{ COD eliminat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(0)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAREA ABIOTICĂ** (opțional)

$$\%\text{degradare abiotică} = \frac{\text{formare } CO_2 \text{ în vas steril după 28 de zile (mg)}}{CO_2T \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTEA V. **TESTUL DE RESPIROMETRIE MANOMETRICĂ** (Metoda C.4-D)

V.1. PRINCIPIUL METODEI

Un volum măsurat de mediu mineral inoculat, cu o concentrație cunoscută din substanța de testat (100 mg/litru de substanță testată, pentru a rezulta cel puțin 50-100 mg CTO/litru), ca unică sursă nominală de carbon organic, este agitat într-un vas închis, la o temperatură constantă (± 1 °C sau mai apropiat) timp de mai mult de 28 zile. Consumul de oxigen se determină fie prin măsurarea cantității de oxigen (produs electrolitic) necesare pentru menținerea constantă a volumului de gaz din vasul respirometrului, fie din schimbări ale volumului sau presiunii (sau o combinație a celor două) în aparatură. Dioxidul de carbon degajat este absorbit într-o soluție de hidroxid de potasiu sau într-un alt absorbant potrivit. Cantitatea de oxigen consumată de substanța de testat (corectată cu cea consumată de proba martor cu inocul testat în paralel) este exprimată ca procent de CTO sau CCO. Opțional, biodegradabilitatea primară poate fi de asemenea calculată prin analize specifice suplimentare, făcute la începutul și la sfârșitul incubării, iar biodegradabilitatea finală prin analiza COD.

V.2. DESCRIEREA METODEI

V.2.1. **Aparatură**

(a) respirometru adecvat;

(b) dispozitiv martor a temperaturii, menținută la ± 1 °C sau mai precis;

(c) dispozitiv de filtrare prin membrană (opțional);

(d) analizor de carbon (opțional).

V.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă 10 ml soluție (a) cu 800 ml apă de diluție, se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b)-(d) și se completează până la 1 litru cu apă de diluție.

V.2.3. **Prepararea și precondiționarea inoculului**

Inoculul poate proveni de la o varietate de surse: nămol activ, efluenți menajeri, ape de suprafață, soluri sau dintr-un amestec al acestora.

A se vedea punctele I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 și I.6.5.

V.2.4. **Pregătirea vaselor**

Folosind soluții mamă, se prepară în șarje separate soluții ale substanțelor de testat și de referință în mediu mineral, astfel încât să rezulte, de regulă, o concentrație de 100 mg substanță/litru (rezultând cel puțin 50-100 mg CTO/litru).

▼B

Se calculează CTO pe baza formării sărurilor de amoniu, dacă nu se anticipează nitrificarea, caz în care calculul va fi bazat pe formarea nitraților (a se vedea apendicele 2 punctul 2).

Se determină valorile pH-ului și, dacă este necesar, se reglează la 7,4 ± 0,2.

Substanțele greu solubile vor fi adăugate în ultima etapă (a se vedea mai jos).

Dacă se determină toxicitatea substanței de testat, se prepară o altă soluție în mediu mineral ce conține atât substanță de testat, cât și substanță de referință, în concentrații similare cu cele ale soluțiilor individuale.

Dacă sunt necesare măsurători ale consumului fizico-chimic de oxigen se prepară o soluție a substanței de testat având de regulă 100 mg CTO/litru, care se sterilizează prin adăugarea unei substanțe toxice potrivite (a se vedea punctul I.6.6).

Se introduc volumele necesare de soluții ale substanței de testat și de referință, în cel puțin două vase. În alte vase se adaugă numai mediu mineral (pentru proba martor cu inocul) și, dacă este necesar, soluția comună de substanță de testat/substanță de referință și soluția sterilă.

Dacă substanța de testat este puțin solubilă, se adaugă direct în această etapă în funcție de cantitate sau volum sau este tratată conform descrierii din apendicele 3. Se adaugă hidroxid de potasiu, pelete de hidroxid de calciu sau alt absorbant în compartimentele vasului de absorbție a CO_2.

V.2.5. **Numărul de vase într-un test tipic**

Vasele 1 și 2: suspensie de testare

Vasele 3 și 4: proba martor cu inocul

Vasul 5: martor de metodă

De preferință și când este necesar, se folosesc:

Vasul 6: martor steril

Vasul 7: martor de toxicitate

A se vedea, de asemenea, punctul I.6.7.

V.2.6. **Desfășurarea testului**

Se lasă vasele să atingă temperatura dorită, iar apoi se inoculează cu nămol activ preparat sau cu altă sursă de inocul, pentru a obține o concentrație de solide în suspensie nu mai mare de 30 mg/litru. Se asamblează echipamentul, se pornește agitatorul, se verifică etanșarea și se pornește măsurarea consumului de oxigen. De obicei, nu este necesară altă supraveghere în afara citirilor și verificărilor zilnice pentru a urmări menținerea unei temperaturi corecte și unei agitări adecvate.

Se calculează consumul de oxigen din citirile efectuate la intervale regulate și frecvente, folosind metodele date de producătorul echipamentului. La sfârșitul incubării, în mod normal după 28 zile, se măsoară pH-ul soluțiilor din vase, în special în cazul în care consumurile de oxigen sunt scăzute sau mai mici decât CTO_{NH4} (pentru compușii care conțin azot).

▼B

Dacă este necesar, se prelevează probe inițiale și finale din vasele respirometrului, pentru analiza COD sau dozarea substanței (a se vedea apendicele 2 punctul 4). După prelevarea inițială, se înregistrează volumul suspensiei rămasă în vas. Când oxigenul este consumat de substanța de testat ce conține azot, se determină creșterea concentrației de nitrit și nitrat după 28 zile și se calculează corecția pentru oxigenul consumat prin nitrificare (apendicele 5).

V.3. DATE ȘI RAPORT

V.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Se împarte consumul de oxigen (mg) al substanței de testat după un timp dat (corectat cu acela al probei martor cu inocul după același timp) la cantitatea de substanță folosită. Rezultă CBO exprimat ca mg oxigen/mg substanță testată, după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumat de substanța de testare} - \text{mg } O_2 \text{ consumat de blanc})}{(\text{mg substanța de testare în vas})}$$

Procentul de biodegradare se calculează din:

$$\%\ \text{biodegradare} = \%\ \text{CTO} = \frac{\%\ \text{CBO}((\text{mg } O_2/\text{mg substanță}))}{\text{CTO}((\text{mg } O_2\text{substanță}))} \times 100$$

sau din:

$$\%\ \text{CCO} = \frac{\%\ \text{CBO}((\text{mg } O_2/\text{mg substanță}))}{\text{CCO}((\text{mg } O_2\text{substanță}))} \times 100$$

Trebuie remarcat că aceste două metode nu dau în mod necesar aceeași valoare; este preferabil să fie folosită prima metodă.

Pentru substanțele de testat ce conțin azot, se folosește CTO adecvat (NH_4 sau NO_3), în conformitate cu datele cunoscute sau anticipate cu privire la incidența nitrificării (apendicele 2 punctul 2). Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, se calculează corecția pentru oxigenul consumat prin nitrificare din schimbarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

În cazul în care se fac determinări opționale ale carbonului organic și/sau ale unei substanțe specifice, se calculează degradarea procentuală, conform descrierii de la punctul I.7.

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date anexate.

V.3.2. **Validarea rezultatelor**

Consumul de oxigen al martorului cu inocul este în mod normal de 20-30 mg O_2/litru și nu este mai mare de 60 mg/litru în 28 zile. Valorile mai mari de 60 mg/litru necesită un examen critic al datelor și tehnicilor experimentale. Dacă valoarea pH-ului este în afara intervalului 6-8,5 iar consumul de oxigen de către substanța chimică de testat este mai mic de 60 %, testul se repetă cu o concentrație mai mică a substanței de testat.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

▼B

V.3.3. **Raport**

A se vedea punctul I.8.

V.4. **FIȘA DE DATE**

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

TEST DE RESPIROMETRIE MANOMETRICĂ

1. **LABORATORUL**

2. **DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI**

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/litru

Concentrația inițială în mediu, C_0: mg/litru

Volumul vasului de testare (V): ml

CTO sau CCO: mg O_2/mg substanță testată (NH_4, NO_3)

4. **INOCUL**

Sursa:

Tratament aplicat:

Precondiționare, dacă există:

Concentrația de solide în suspensie în amestecul de reacție: mg/l

5. **CONSUM DE OXIGEN: BIODEGRADABILITATE**

		Ziua											
		0		7		14			21			28	
Consumul de O_2 (mg) al substanței de testat	1												
	2												
	a, medie												
Consumul de O_2 (mg) al probei martor	3												
	4												
	b, medie												
CBO corectat (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
CBO (mg) substanță de testat	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Ziua											
		0		7		14			21			28	
% degradare $\frac{CBO}{CTO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Media (*)												

V = volumul mediului mineral din vasul de testare
(*) D_1 și D_2 nu se exprimă ca medie dacă există o diferență considerabilă.

N.B.: Formate similare pot fi folosite pentru substanța de referință și pentru martorii de toxicitate.

6. **CORECȚIA PENTRU NITRIFICARE** (a se vedea apendicele 5)

Ziua		0	28	Diferența
(i)	Concentrația de nitrat (mg N/litru)			(N)
(ii)	Echivalentul de oxigen (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Concentrația de nitrat (mg N/litru)			(N)
(iv)	Echivalentul de oxigen (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii) + (iv)	Echivalentul oxigenului total	—	—	

7. **ANALIZA CARBONULUI** (opțional)

Analizorul de carbon:

Timpul (zile)	Proba martor mg/litru	Substanța de testat mg/litru
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) sau la sfârșitul incubării

$$\% \text{ COD eliminat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b0}}\right) \times 100$$

8. **SUBSTANȚA SPECIFICĂ** (opțional)

S_b = concentrația în controlul fizico-chimic (steril) după 28 zile

S_a = concentrația în vasul inoculat după 28 zile

$$\% \text{ biodegradare} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADARE ABIOTICĂ** (opțional)

a = consumul de oxigen din vasul steril după 28 zile, (mg)

$$\text{consumul de oxigen pe mg substanță de testat} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(a se vedea punctele 1 și 3)

$$\%\text{degradare abiotică} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

PARTEA VI – **TESTUL CU VAS ÎNCHIS** (Metoda C.4-E)

VI.1. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Soluția de substanță de testat în mediu mineral, de obicei 2-5 mg/litru, se inoculează cu un număr relativ mic de microorganisme dintr-o populație bacteriană mixtă, în vase de testare complet pline, închise, ținute la întuneric, la temperatură constantă. Degradarea este urmată de analiza oxigenului dizolvat după o perioadă de 28 zile. Cantitatea de oxigen consumată de către substanța de testat, corectată cu consumul din proba martor cu inocul, testat în paralel, se exprimă ca procent de CTO sau CCO.

VI.2. DESCRIEREA METODEI

VI.2.1. **Aparatură**

(a) vase CBO, cu dopuri de sticlă, de exemplu de 250-300 ml;

(b) baie de apă sau incubator, pentru păstrarea vaselor la temperatură constantă (± 1 °C sau mai precis) și la întuneric;

(c) vase mari (2-5 litri) pentru prepararea mediului și pentru umplerea vaselor CBO;

(d) oxigenometru sau echipament și reactivi pentru titrarea Winkler.

VI.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Pentru prepararea soluțiilor mamă, a se vedea punctul I.6.2.

Se amestecă câte 1 ml din soluțiile (a)-(d) și se aduce la 1 litru cu apă de diluție.

VI.2.3. **Prepararea inoculului**

Inoculul provine în mod normal din efluentul secundar al instalației de epurare sau din sedimentul provenit predominant de la apa uzată menajeră. O sursă alternativă de inocul este apa de suprafață. În mod normal, se folosește de la o picătură (0,05 ml) până la 5 ml de filtrat pe litru de mediu; pot fi necesare experimentări pentru a determina volumul optim pentru un efluent dat (a se vedea punctele I.6.4.2 și I.6.5).

VI.2.4. **Pregătirea vaselor**

Se aerează puternic mediul mineral timp de cel puțin 20 min. Fiecare serie de teste se efectuează cu mediu mineral provenit din același lot. În general, mediul este gata pentru folosire după păstrarea sa la temperatura de testare timp de 20 ore. Se determină concentrația oxigenului dizolvat pentru control; valoarea va fi de aproximativ 9 mg/litru la 20 °C. Toate operațiile de transfer și umplere se efectuează într-un mediu saturat cu oxigen, fără barbotare, prin folosirea sifoanelor.

▼B

Se pregătesc grupuri paralele de vase CBO cu substanță de testat și de referință pentru determinări în serii experimentale simultane. Se montează un număr suficient de vase CBO, inclusiv proba martor cu inocul, pentru a permite ca măsurătorile duplicate ale consumului de oxigen să fie făcute la intervalele de timp dorite, de exemplu, după 0, 7, 14, 21 și 28 de zile. Pentru a fi posibilă identificarea ferestrei de 10 zile, se folosesc mai multe vase.

Vasele mari se umplu o treime cu mediu mineral aerat. Apoi se adaugă soluții mamă de substanță testată și de referință în vase mari separate, în cantități suficiente pentru a obține o concentrație finală a substanțelor mai mică de 10 mg/litru. Nu se adaugă nicio substanță la mediul probei martor cu inocul, conținut într-un alt vas mare.

Pentru a nu limita activitatea inoculului, concentrația oxigenului dizolvat nu trebuie să scadă sub 0,5 mg/litru în vasele CBO. Aceasta limitează concentrația substanței de testat la aproximativ 2 mg/litru. Cu toate acestea, pentru compușii puțin degradabili și pentru aceia cu un CTO mic, se pot folosi 5-10 mg/litru. În unele cazuri, se recomandă să se efectueze serii paralele cu substanță de testat la două concentrații diferite, de exemplu, 2 și 5 mg/litru. În mod normal, se calculează CTO pe baza formării sărurilor de amoniu dar, dacă se presupune sau se știe că are loc nitrificarea, se calculează pe baza formării nitratului (CTO_{NO3}: a se vedea apendicele 2 punctul 2). Cu toate acestea, dacă nitrificarea nu este completă, dar are loc, se corectează cu modificările în concentrațiile de nitrit și de nitrat, determinate prin analiză (a se vedea apendicele 5).

Dacă trebuie determinată toxicitatea substanței de testat (de exemplu, în cazul în care au fost găsite anterior valori de biodegradabilitate scăzute), este necesară o altă serie de vase.

Se pregătește un alt vas mare ce conține mediu mineral aerat (aproximativ o treime din volumul său) plus substanță de testat și substanță de referință la aceleași concentrații finale ca și acelea din celelalte vase mari.

Se inoculează soluțiile din vasele mari cu efluent secundar (de la o picătură sau aproximativ 0,05 ml până la 5 ml/litru) sau cu o altă sursă cum ar fi apă de râu (a se vedea punctul I.6.4.2). În final, se aduc soluțiile la volum cu mediu mineral aerat folosind un furtun care ajunge la fundul vasului pentru a realiza o amestecare adecvată.

VI.2.5. **Numărul de vase într-un test tipic**

Într-un test tipic sunt folosite următoarele vase:

— cel puțin 10 conținând substanță de testat și inocul (suspensia de testare);

— cel puțin 10 conținând numai inocul (proba martor cu inocul);

— cel puțin 10 conținând substanța de referință și inocul (martor de metodă);

▼B

— și, dacă este necesar, 6 vase conținând substanță de testat, substanță de referință și inocul (martor de toxicitate). În plus, pentru a fi posibilă identificarea ferestrei de 10 zile, sunt necesare aproape de două ori mai multe vase.

VI.2.6. Desfășurarea testului

Fiecare soluție preparată se distribuie imediat în vasele CBO din grupul respectiv, prin furtun, din sfertul inferior (nu la bază) al vasului mare corespunzător, astfel încât toate vasele CBO să fie complet umplute. Se lovesc ușor pentru a îndepărta bulele de aer. Se analizează imediat, la momentul zero, oxigenul dizolvat din vase, prin metoda Winkler sau prin metoda electrodului. Conținutul vaselor poate fi păstrat pentru a fi analizat mai târziu, prin metoda Winkler, prin adăugarea de sulfat de magneziu (II) și de hidroxid de sodiu (primul reactiv Winkler). Se depozitează vasele închise cu grijă, ce conțin oxigen fixat ca oxid brun de magneziu (III) hidratat, la întuneric, la 10-20 ^{o}C, timp de cel mult 24 de ore, înainte de efectuarea etapelor rămase ale metodei Winkler. Se astupă cu dop vasele replicate rămase, urmărind să nu fie incluse bule de aer, și se incubează la 20 ^{o}C, la întuneric. Fiecare serie experimentală este însoțită de o serie paralelă completă, pentru determinarea probei martor inoculate. Se prelevează probe din vasele duplicate, din toate seriile, pentru analiza oxigenului dizolvat la intervale egale de timp (cel puțin săptămânal), de-a lungul celor 28 zile de incubare.

Probele prelevate săptămânal permit evaluarea procentului de eliminare în fereastra de 14 zile, în timp ce prelevarea de probe la 3-4 zile permite identificarea ferestrei de 10 zile, care necesită dublarea numărului celor mai multe vase.

Pentru substanțele de testat care conțin azot, se fac corecții ale consumului de oxigen necesar oricărei nitrificări care ar avea loc. În acest scop, se folosește metoda electrodului de O_2 pentru determinarea concentrației oxigenului dizolvat și apoi se prelevează o probă din vasul CBO pentru analiza nitritului și nitratului. Din creșterea concentrației de nitrit și nitrat se calculează oxigenul folosit (a se vedea apendicele 5).

VI.3. DATE ȘI RAPORT

VI.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Mai întâi se calculează CBO la fiecare interval, scăzând cantitatea de oxigen consumat (mg O_2/litru) de proba martor cu inocul din cantitatea consumată de substanța de testat. Se împarte acest consum corectat la concentrația substanței de testat (mg/litru), pentru a obține CBO specific ca mg oxigen pe mg substanță testată. Se calculează procentul de biodegradabilitate prin împărțirea CBO specific la CTO specific (calculat în conformitate cu apendicele 2 punctul 2) sau CCO (determinat prin analiză, a se vedea apendicele 2 punctul 3), după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumat de substanță de testat} - \text{mg } O_2 \text{ consumat de proba martor})}{(\text{substanță de testat în vas})}$$

▼B

= mg O_2 pe mg substanță de testat

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{CBO}((\text{mg } O_2/\text{mg substanță}))}{\text{CTO}((\text{mg } O_2/\text{mg substanță}))} \times 100$$

sau

$$\% \text{ degradare} = \frac{\text{CBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substanță})}{\text{CCO}(\text{mg } O_2/\text{mg substanță})} \times 100$$

Trebuie remarcat că aceste două metode nu conduc în mod necesar la aceeași valoare; este preferabil să se utilizeze prima metodă.

Pentru substanțele de testat ce conțin azot, se folosește CTO (NH_4 sau NO_3) în funcție de datele cunoscute sau anticipate privind incidența nitrificării (apendicele 2 punctul 2). Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, se calculează corecția pentru oxigenul consumat la nitrificare din modificarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

VI.3.2. **Validarea rezultatelor**

Scăderea conținutului de oxigen în martorul cu inocul nu trebuie să depășească 1,5 mg oxigen dizolvat/litru, după 28 zile. Valorile mai mari decât aceasta impun investigarea tehnicilor experimentale. Concentrațiile reziduale de oxigen din vasele de testare nu trebuie în niciun moment să scadă sub 0,5 mg/litru. Astfel, nivele de oxigen mai scăzute sunt valide numai dacă metoda de determinare a oxigenului dizolvat folosită este capabilă de măsurarea cu precizie a unor astfel de niveluri de concentrație.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

VI.3.3. **Raport**

A se vedea punctul I.8.

VI.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

TEST ÎN VAS ÎNCHIS

1. **LABORATOR**

2. **DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI**

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/litru

Concentrația inițială în vas: mg/litru

CTO sau CCO: mg O_2/mg substanță testată

4. **INOCUL**

Sursă:

Tratamentul aplicat:

▼B

Precondiționare, dacă există:

Concentrația în amestecul de reacție: mg/litru

5. **DETERMINAREA OD**

Metoda: Winkler/electrod

Analizele vaselor

Timpul de incubare (zile)			OD (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Proba martor (fără substanță)	1	C_1				
	2	C_2				
Media	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Substanța de testat	1	a_1				
	2	a_2				
Media	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Notă: Un format similar poate fi folosit pentru substanța de referință și martorul de toxicitate.

6. **CORECȚIA PENTRU NITRIFICARE** (a se vedea apendicele 5)

Timpul de incubare (zile)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentrația de nitrat (mg N/litru)				
(ii)	Modificarea concentrației de nitrat (mg N/litru)	—			
(iii)	Echivalentul de oxigen (mg/litru)	—			
(iv)	Concentrația de nitrit (mg N/litru)				
(v)	Modificarea concentrației de nitrat (mg N/litru)	—			
(vi)	Echivalentul de oxigen (mg/litru)	—			
(iii) + (vi)	Echivalentul de oxigen total (mg/litru)	—			

7. **CONSUM DE OD: % DEGRADARE**

	Îndepărtarea după n zile (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
VAS 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
VAS 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Îndepărtarea după n zile (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
VAS 1 $\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{CTO subst}}$				
VAS 2 $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{CTO subst}}$				
$\%$ medie (*) $= \frac{D_1 \cdot D_2}{2}$				

(*) Nu se va lua în considerare media dacă este o diferență considerabilă între replici.

m_{t0} = valoarea în vasul de testare la momentul 0

m_{tx} = valoarea în vasul de testare la momentul x

m_{b0} = valoarea medie a probei martor la momentul 0

m_{bx} = valoarea medie a probei martor la momentul x

Se aplică, de asemenea, corecții pentru nitrificare la punctul (iii) + (vi) în punctul 6.

8. **CONSUM DE OD ÎN PROBA MARTOR**

Consumul de oxigen al probei martor: (m_{b0} – m_{b28}) mg/litru. Consumul este important pentru validarea testului. El trebuie să fie mai mic de 1,5 mg/litru.

PARTEA VII – **TESTUL MITI (METODA C.4-F)**

VII.1. PRINCIPIUL METODEI

Consumul de oxigen al soluției sau al suspensiei sub agitare de substanță de testat în mediu mineral, inoculată cu microorganisme mature, neadaptate, se măsoară automat după o perioadă de 28 zile într-un respirometru cu circuit închis, la întuneric, la 25 ± 1 °C. Dioxidul de carbon degajat este absorbit în calce sodică. Biodegradabilitatea este exprimată ca procent de oxigen absorbit (corectat cu absorbția în proba martor) față de absorbția teoretică (CTO). Procentul biodegradabilității primare se calculează de asemenea din analiza chimică specifică suplimentară realizată la începutul și la sfârșitul incubării și, opțional, prin analiza COD.

VII.2. DESCRIEREA METODEI

VII.2.1. **Aparatură**

(a) aparat automat de măsurare electrolitică a CBO sau respirometru normal echipat cu 6 vase de 300 ml fiecare și cu capsule ce conțin absorbant de CO_2;

▼B

(b) cameră cu temperatură constantă și/sau baie de apă la 25 ± 1 °C sau mai mult;

(c) dispozitiv de filtrare cu membrană (opțional);

(d) analizor de carbon (opțional).

VII.2.2. **Prepararea mediului mineral**

Se prepară următoarele soluții mamă, folosind reactivi puri pentru analiză și apă (I.6.1):

(a)	Ortofosfat diacid de potasiu, KH_2PO_4	8,50 g
	Ortofosfat monoacid de potasiu, K_2HPO_4	21,75 g
	Ortofosfat monoacid de sodiu dodecahidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	44,60 g
	Clorură de amoniu, NH_4Cl	1,70 g
	Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.	
	Valoarea pH-ului soluției va fi de 7,2.	
(b)	Sulfat de magneziu heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	22,50 g
	Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.	
(c)	Clorură de calciu anhidră, $CaCl_2$	27,50 g
	Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.	
(d)	Clorură de fier (III) hexahidrat, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,25 g
	Se dizolvă în apă și se aduce la 1 litru.	

Se iau 3 ml din fiecare soluție (a), (b), (c) și (d) și se aduce soluția la 1 litru.

VII.2.3. **Prepararea inoculului**

Se prelevează probe proaspete din cel puțin zece locuri, în principal din ariile unde sunt folosite și descărcate diferite substanțe chimice. Din locuri cum ar fi instalații de tratare a nămolurilor, stații de epurare ale apelor uzate industriale, râuri, lacuri, mări, se prelevează probe de 1 l de nămol, sol de suprafață, apă etc. și se amestecă bine. După îndepărtarea materiilor plutitoare și după decantare, se reglează pH-ul supernatantului la 7 ± 1 cu hidroxid de sodiu sau acid fosforic.

Se folosește un volum adecvat de supernatant filtrat pentru a umple cu nămol activ un vas de încărcare-descărcare și se aerează lichidul aproximativ 23 1/2 h. După treizeci de minute de la oprirea aerării se îndepărtează aproximativ o treime din întregul volum al supernatantului și se adaugă la materialul sedimentat un volum egal de soluție (pH 7) ce conține 0,1 % glucoză, 0,1 % peptonă și 0,1 % ortofosfat diacid de potasiu și se reîncepe aerarea. Se repetă această procedură o dată pe zi. Operarea instalației cu nămol se face conform bunelor practici de laborator: efluenții sunt limpezi, temperatura este menținută la 25 ± 2 °C, pH-ul este 7 ± 1, nămolul sedimentează bine, există suficientă aerare pentru a păstra amestecul în condiții aerobe tot timpul, protozoarele sunt prezente și activitatea nămolului este testată față de o substanță de referință cel puțin la fiecare trei luni. Nu se folosește nămolul ca inocul decât după cel puțin o lună de întreținere, dar nu după mai mult de patru luni. Prin urmare, se vor preleva probe din cel puțin 10 locuri la intervale egale, o dată la trei luni.

▼B

Pentru a menține nămolul proaspăt și pe cel vechi la aceeași activitate, se amestecă supernatantul filtrat de la nămolul activ în uz cu un volum egal de supernatant filtrat de la un amestec proaspăt prelevat din zece surse și se cultivă lichidul combinat ca mai sus. Se prelevează nămol pentru folosire ca inocul după 18-24 de ore de la alimentarea instalației.

VII.2.4. **Pregătirea vaselor**

Se pregătesc următoarele șase vase, astfel încât să conțină:

Nr. 1: substanța de testat în apă de diluție la 100 mg/l

Nr. 2, 3 și 4: substanța de testat în mediu mineral la 100 mg/l

Nr. 5: substanța de referință (de exemplu anilină) în mediu mineral la 100 mg/l

Nr. 6: numai mediu mineral

Substanțele de testat greu solubile se adaugă direct, în funcție de cantitate sau de volum, sau se tratează conform descrierii din apendicele 3, excepție făcând faptul că nu se folosesc solvenți și nici agenți de emulsionare. Se adaugă la toate vasele absorbanți de CO_2 în capsulele speciale prevăzute în acest scop. Se reglează pH-ul din vasele 2, 3 și 4 la valoarea de 7,0.

VII.2.5. **Efectuarea testului**

Se inoculează vasele nr. 2, 3 și 4 (cu suspensie de testare), nr. 5 (martor de activitate) și nr. 6 (probă martor cu inocul) cu un mic volum de inocul pentru a rezulta o concentrație de 30 mg/l de solide în suspensie. Nu se adaugă inocul vasului nr. 1 care servește drept martor abiotic. Se montează echipamentul, se verifică etanșeitatea, se pornește agitarea și se încep măsurătorile de consum de oxigen la întuneric. Zilnic se verifică temperatura, agitatorul și înregistratorul oxigenului consumat și se notează orice schimbare a culorii conținutului vaselor. Se citește direct consumul de oxigen la șase vase, printr-o metodă adecvată, de exemplu, prin intermediul unui înregistrator cu diagramă cu șase puncte, care furnizează curba CBO. La sfârșitul incubării, în mod normal după 28 zile, se măsoară pH-ul conținutului vaselor și se determină concentrația substanței de testat rămasă și a oricărui intermediar și, în cazul substanțelor solubile în apă, concentrația de COD (apendicele 2 punctul 4). Este necesară o atenție deosebită în cazul substanțelor volatile. Dacă se anticipează nitrificarea, se determină concentrația de nitrat și de nitrit, dacă este posibil.

VII.3. DATE ȘI RAPORT

VII.3.1. **Interpretarea rezultatelor**

Se împarte consumul de oxigen (mg) al substanței de testat, corectat cu acela citit la proba martor cu inocul după același timp, la cantitatea substanței de testat folosită. Rezultă CBO, exprimat ca mg oxigen/mg substanță testată, după cum urmează:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumat de substanță de testat} - \text{mg } O_2 \text{ consumat de proba martor})}{(\text{mg substanță de testat în vas})}$$

= mg O_2 pe mg substanță de testat

▼B

Procentul de biodegradare se obține apoi din:

$$\% \text{ biodegradare} = \% \text{ CTO} = \frac{\text{CBO(mg } O_2/\text{mg substanță)}}{\text{CTO(mg } O_2/\text{mg substanță)}} \times 100$$

Pentru amestecuri se calculează CTO din analiza elementară, ca și pentru compușii simpli. Se folosește CTO adecvat (CTO_{NH4} sau CTO_{NO3}) dacă nitrificarea este absentă sau este completă (apendicele 2 punctul 2). Dacă totuși nitrificarea are loc, dar este incompletă, se face o corecție pentru consumul de oxigen la nitrificare, calculat din modificarea concentrațiilor de nitrit și nitrat (apendicele 5).

Se calculează procentul de biodegradare primară cu ajutorul pierderii de substanță chimică inițială (a se vedea punctul I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Dacă s-a înregistrat o pierdere de substanță în vasul nr. 1, care măsoară eliminarea fizico-chimică, această constatare se consemnează și se folosește concentrația de substanță (S_b) după 28 zile din acest vas pentru a se calcula biodegradarea procentuală.

Când se fac determinări de COD (opțional), se calculează biodegradarea procentuală finală din:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

conform descrierii de la punctul I.7.1. Dacă s-a înregistrat o pierdere de COD în vasul nr. 1, care măsoară eliminarea fizico-chimică, concentrația de COD din acest vas se folosește pentru a calcula biodegradarea procentuală.

Se înregistrează toate rezultatele pe fișele de date atașate.

VII.3.2. **Validarea rezultatelor**

Consumul de oxigen în proba martor cu inocul este în mod normal 20-30 mg O_2/l și nu trebuie să fie mai mare de 60 mg/l în timpul celor 28 de zile. Valorile mai mari de 60 mg/l necesită un examen critic al datelor și al tehnicilor experimentale. Dacă valoarea pH-ului este în afara intervalului 6-8,5 și consumul de oxigen al substanței de testat este mai mic de 60 %, testul se repetă cu o concentrație mai mică a substanței.

A se vedea, de asemenea, punctul I.5.2.

Dacă procentul de degradare al anilinei, calculat din consumul de oxigen, nu depășește 40 % după 7 zile și 65 % după 14 zile, testul este invalidat.

VII.3.3. **Raport**

A se vedea punctul I.8.

VII.4. FIȘA DE DATE

Un exemplu de fișă de date este prezentat mai jos.

TESTUL MITI (I)

1. **LABORATORUL**

2. **DATE LA ÎNCEPUTUL TESTULUI**

▼B

3. **SUBSTANȚA DE TESTAT**

Denumire:

Concentrația soluției mamă: mg/l substanță de testat

Concentrația inițială în mediul mineral, C_0: mg/l substanță de testat

Volumul amestecului de reacție, V: ml

CTO: mg O_2/l

4. **INOCUL**

Locurile de prelevare a probelor de nămol:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Concentrația materiilor solide în suspensie în nămolul activ după aclimatizare cu apă uzată sintetică = ... mg/l

Volumul de nămol activ pe litru de mediu mineral final = ...ml

Concentrația de nămol în mediul mineral final = ...mg/l

5. **CONSUMUL DE OXIGEN: BIODEGRADABILITATEA**

Tipul de respirometru folosit:

			Ziua				
			0	7	14	21	28
Consumul de O_2 la substanța de testat	a_1						
	a_2						
	a_3						
Consumul de O_2 (mg) la proba martor	b						
Consumul de O_2 (mg) corectat	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
CBO/mg substanță de testat	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	Vas 1					
		Vas 2					
		Vas 3					
% degradare $\frac{CBO}{CTO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		media (*)					

(*) Nu se face o medie dacă sunt diferențe considerabile între replici.

▼B

Notă: Formate similare pot fi folosite pentru substanța de referință.

6. **ANALIZA DE CARBON** (opțional)

Analizorul de carbon:

Vas	COD				Îndepărtat % COD	Media
	Măsurat		Corectat			
Apă + substanță de testat	a				—	—
Nămol + substanță de testat	b_1		$b_1 - c$			
Nămol + substanță de testat	b_2		$b_2 - c$			
Nămol + substanță de testat	b_3		$b_3 - c$			
Probă martor cu inocul	c		—		—	—

$$\% \text{ COD eliminat} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATE ANALITICE SPECIFICE SUBSTANȚEI**

	Cantitatea rămasă de substanță de testat la sfârșitul testului	% de degradare
probă martor cu apă	S_b	
mediu inoculat	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\text{degradare} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Se calculează % degradare pentru vasele a_1, a_2 și a_3.

8. **OBSERVAȚII**

Se atașează curba CBO în funcție de timp, dacă este disponibilă.

▼B

Apendicele 1

ABREVIERI ȘI DEFINIȚII

OD: Oxigenul dizolvat (mg/l) este concentrația de oxigen dizolvat într-o probă de apă.

CBO: Consumul biochimic de oxigen (g) este cantitatea de oxigen consumată de microorganisme când se metabolizează un compus de testat; de asemenea, se exprimă în g de oxigen consumat pe g substanță testată (a se vedea metoda C.5).

CCO: Consumul chimic de oxigen (g) este cantitatea de oxigen consumată în timpul oxidării unui compus de testat cu dicromat acid fierbinte; el furnizează o măsură a cantității prezente de materie oxidabilă; se exprimă și ca g oxigen consumat pe g compus de testat (a se vedea metoda C.6).

COD: Carbonul organic dizolvat este carbonul organic prezent în soluție sau acela care trece printr-un filtru de 0,45 microni sau rămâne în supernatant după centrifugare la 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (± 4 000 g) timp de 15 min.

CTO: Consumul teoretic de oxigen (mg) este cantitatea totală de oxigen necesară pentru a oxida complet substanța; este calculat din formula moleculară (a se vedea apendicele 2 punctul 2) și este de asemenea exprimat ca mg oxigen necesar pe mg compus de testat.

CO_2T: Cantitatea teoretică de dioxid de carbon (mg) este cantitatea de dioxid de carbon calculată din conținutul de carbon cunoscut sau măsurat al compusului de testat când acesta este complet mineralizat; se exprimă și ca mg dioxid de carbon degajat pe mg substanță.

COT: Carbonul organic total al probei este suma carbonului organic în soluție și în suspensie.

CA: Carbonul anorganic

CT: Carbonul total este suma carbonului organic și anorganic prezent în eșantion.

Biodegradarea primară:

este modificarea structurii chimice a substanței, produsă prin acțiune biologică, care are ca rezultat pierderea proprietăților specifice ale substanței.

Biodegradarea finală (aerobică):

este nivelul de degradare realizat când substanța de testat este complet folosită de microorganisme având ca rezultat producerea de dioxid de carbon, apă, săruri minerale și noi constituenți celulari microbieni (biomasă).

Ușor biodegradabil:

o clasificare arbitrară a substanțelor care au trecut anumite teste de screening specificate pentru biodegradabilitatea finală; aceste teste sunt atât de riguroase încât se admite că asemenea compuși se vor degrada biologic rapid și complet în medii acvatice în condiții aerobe.

▼B

Intrinsec biodegradabil:

o clasificare a substanțelor pentru care există probe neechivoce de biodegradare (primară sau finală) în orice test de biodegradabilitate recunoscut.

Tratabilitate:

este capacitatea substanțelor de a fi eliminate în timpul tratamentului biologic al apelor reziduale fără a afecta negativ funcționarea normală a procesului de tratare. În general, compușii ușor biodegradabili sunt tratabili, dar nu este cazul tuturor sunt compuși intrinsec biodegradabili. Se pot produce, de asemenea, și procese abiotice.

Timpul de latență

este timpul de la inoculare, în testul de epuizare, până când procentul de degradare crește cel puțin până la 10 %. Timpul de latență este adesea foarte variabil și slab reproductibil.

Timpul de degradare

este timpul de la sfârșitul perioadei de latență până în momentul în care se atinge 90 % din nivelul maxim de degradare.

Fereastra de 10 zile

este intervalul de 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % degradare.

▼B

Apendicele 2

CALCULAREA ŞI DETERMINAREA UNOR PARAMETRI SINTETICI ADECVAȚI

În funcție de metoda aleasă, sunt necesari anumiți parametri sintetici. Următoarea secțiune descrie modul de obținere a acestor valori. Folosirea acestor parametri este descrisă la fiecare metodă.

1. **Conținutul de carbon**

Conținutul de carbon se calculează din compoziția elementară cunoscută sau determinată din analiza elementară a substanței de testat.

2. **Consumul teoretic de oxigen (CTO)**

Consumul teoretic de oxigen (CTO) poate fi calculat dacă este cunoscută compoziția elementară sau este determinată prin analiză elementară. Acesta este, pentru compusul

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

fără nitrificare,

$$CTO_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

sau cu nitrificare,

$$CTO_{NO3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. **Consumul chimic de oxigen (CCO)**

Consumul chimic de oxigen (CCO) se determină în conformitate cu metoda C.6.

4. **Carbonul organic dizolvat (COD)**

Carbonul organic dizolvat (COD) este prin definiție carbonul organic al unei substanțe sau al unui amestec în apă care trece prin filtrul de 0,45 microni.

Se iau probe din vasele de testare și se filtrează imediat în aparatul de filtrare, folosind un filtru cu membrana adecvată. Primii 20 ml (cantitatea poate fi redusă când se folosesc filtre mici) de filtrat sunt eliminați. Volume de 10-20 ml sau mai mici, dacă sunt injectate (volumul depinde de cantitatea necesară la analizorul de carbon) sunt reținute pentru analiza carbonului. Concentrația COD se determină cu ajutorul unui analizor de carbon organic care poate măsura exact o concentrație de carbon echivalentă sau mai mică de 10 % din concentrația inițială de COD folosită la test.

Probele filtrate care nu pot fi analizate în aceeași zi de lucru pot fi păstrate la frigider, la 2-4°C, timp de 48 de ore sau sub – 18 °C pentru perioade mai lungi.

Observații:

Filtrele cu membrană sunt adesea impregnate cu agenți tensioactivi pentru hidrofilizare. Astfel, filtrul poate conține mai mult de câteva mg de carbon organic solubil care interferează cu determinările de biodegradabilitate. Agenții tensioactivi și alți compuși organici solubili sunt îndepărtați din filtre prin fierbere în apă deionizată timp de trei perioade a câte o oră fiecare. Filtrele pot fi apoi depozitate în apă timp de o săptămână. Dacă se folosesc cartușe de filtrare, fiecare lot trebuie verificat pentru a confirma că nu eliberează carbon organic solubil.

▼B

În funcție de tipul membranei de filtrare, substanța de testat poate fi reținută prin adsorbție. Prin urmare, este recomandabil să se ia măsuri pentru ca substanța să nu fie reținută pe filtru.

Centrifugarea la 40 000 $m \cdot sec^{-2}$ (4 000 g) timp de 15 minute se poate folosi în locul filtrării pentru a face diferența între COT și COD. Metoda nu este viabilă la concentrația inițială de < 10 mg COD/l deoarece fie că nu sunt îndepărtate toate bacteriile, fie că este redizolvat carbonul, ca parte a plasmei bacteriene.

REFERINȚE BILBIOGRAFICE

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, p. 139.

— DIN – Entwurf 38 409, Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), p. 169.

▼B

Apendicele 3

EVALUAREA BIODEGRADABILITĂȚII SUBSTANȚELOR PUȚIN SOLUBILE

În testele de biodegradabilitate aplicate la substanțe puțin solubile, se acordă o deosebită atenție următoarelor aspecte.

Lichidele omogene prezintă rareori probleme de eșantionare, dar în cazul materialelor solide se recomandă omogenizarea cu mijloace adecvate, pentru a evita erorile datorate neomogenității. Se impun precauții speciale în cazul în care sunt necesare eșantioane reprezentative de câteva miligrame din amestecuri sau substanțe cu cantități mari de impurități.

Pot fi folosite diferite forme de agitare în timpul testelor. Se folosește cu atenție numai agitarea suficientă pentru a ține substanța dispersată, evitându-se supraîncălzirea, spumarea excesivă și forțele mari de forfecare.

Poate fi folosit un agent de emulsionare care dă o dispersie stabilă a substanței. Acesta nu trebuie să fie toxic pentru bacterii, biodegradat sau să spumeze în condițiile de testare.

Solvenților li se aplică aceleași criterii ca și agenților de emulsionare.

Nu se recomandă să se folosească purtători solizi pentru substanțele de testat solide, dar pot fi potriviți pentru substanțele uleioase.

Dacă se folosesc substanțe auxiliare cum ar fi agenți de emulsionare, solvenți și purtători, se testează o probă martor ce conține substanța auxiliară.

Unul dintre testele de respirometrie CO_2, CBO, MITI poate fi folosit pentru a studia biodegradabilitatea substanțelor greu solubile.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

— de Morsier, A. *et al.*, Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, p. 833.

— Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, p. 169.

▼B

Apendicele 4

EVALUAREA BIODEGRADABILITATII SUBSTANTELOR SUSCEPTIBILE DE A FI TOXICE PENTRU INOCUL

Când o substanță este supusă testării pentru biodegradabilitate ușoară și pare a fi ne-biodegradabilă, se recomandă următoarea procedură dacă se urmărește distincția între inhibiție și inerție (Reynolds *et al*, 1987).

Se folosesc inoculi similari sau identici pentru testele de toxicitate și biodegradare.

Pentru a evalua toxicitatea substanțelor studiate în testele de biodegradabilitate ușoară, se aplică una dintre metodele următoare: metoda de inhibiție a vitezei de respirație a nămolului (testul de inhibiție a respirației nămolului activ – Directiva 87/302/CEE), CBO și/sau metodele de inhibiție a creșterii sau a unei combinații între acestea.

Dacă trebuie evitată inhibiția datorată toxicității, se propune ca valoarea concentrației substanței de testat folosită în testul de biodegradabilitate ușoară să fie mai mică decât 1/10 din valoarea CE_{50} (sau mai mică decât valoarea CE_{20}) obținută în testul de toxicitate. Compușii cu un CE_{50} mai mare de 300 mg/l nu au, probabil, efecte toxice în testul de biodegradabilitate ușoară.

Valorile CE_{50} mai mici de 20 mg/l probabil pun serioase probleme pentru testările următoare. Se vor folosi concentrații de testare mici, ce necesită folosirea testului în vasului închis, riguros și sensibil, sau folosirea materialului marcat cu C. Ca alternativă, un inocul aclimatizat permite să fie folosite concentrații mai mari ale substanței de testat. În ultimul caz totuși criteriul specific al testului de biodegradabilitate ușoară este pierdut.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Reynolds, L. *et al*., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

Apendicele 5

CORECȚIA CONSUMULUI DE OXIGEN ÎN CAZUL INTERFERENȚEI CU NITRIFICAREA

Erorile datorate omiterii nitrificării la evaluarea consumului de oxigen necesar pentru biodegradarea substanței de testat care nu conține azot sunt minime (nu mai mari de 5 %), chiar dacă oxidarea azotului amoniacal în mediul de testare se produce ocazional atât în vasele cu substanță de testat, cât și în cele cu probă martor. Cu toate acestea, în cazul substanțelor care conțin azot, pot apărea erori grave.

Dacă nitrificarea are loc, dar nu este completă, consumul de oxigen observat al amestecului de reacție poate fi corectat prin cantitatea de oxigen folosită la oxidarea amoniului la nitrit sau la nitrat, dacă modificările concentrației în timpul incubării nitritului și nitratului sunt determinate luând în considerare următoarele ecuații:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Reacția globală este:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Din ecuația (1), consumul de oxigen pentru ca 28 g azot conținut în clorura de amoniu (NH_4Cl) să fie oxidat la nitrit este de 96 g, adică un factor de 3,43 (96/28). În același mod, din ecuația (3) rezultă un consum de oxigen de 128 g pentru ca 28 g de azot să fie oxidat la nitrat, adică un factor de 4,57 (128/28).

Deoarece reacțiile sunt succesive, fiind realizate în prezența unor specii distincte și diferite de bacterii, concentrația de nitrit crește sau descrește; în ultimul caz se formează o concentrație echivalentă de nitrat. Astfel, cantitatea de oxigen consumată pentru formarea nitratului este de 4,57 înmulțit cu creșterea concentrației de nitrat, în timp ce cantitatea de oxigen asociată cu formarea nitritului este de 3,43 înmulțit cu creșterea concentrației de nitrit sau pierderea de oxigen este de - 3,43 înmulțit cu descreșterea concentrației.

Aceasta este:

O_2 consumat la formarea nitratului = 4,57 × creșterea concentrației de nitrat (4)

și

O_2 consumat la formarea nitritului = 3,43 × creșterea concentrației de nitrit (5)

și

O_2 consumat la dispariția nitritului = - 3,43 × descreșterea concentrației de nitrat (6)

astfel încât:

Consumul de O_2 datorat nitrificării = ± 3,43 × modificarea concentrației de nitrit + 4,57 × creșterea concentrației de nitrat (7)

și astfel

Consumul de O_2 datorat oxidării carbonului = consumul total observat – consumul datorită nitrificării (8)

Ca alternativă, dacă se determină numai azotul total oxidat, consumul de oxigen datorat nitrificării poate fi considerat, ca primă aproximație, ca fiind de 4,57 × creșterea azotului oxidat.

Valoarea corectată a consumului de oxigen datorat oxidării carbonului este apoi comparată cu CTO_{NH3}, conform calculelor din apendicele 2.

▼B

C.5. **DEGRADAREA – CONSUMUL BIOCHIMIC DE OXIGEN**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este determinarea consumului biochimic de oxigen (CBO) al substanțelor organice solide sau lichide.

Prin această metodă se pot testa compuși solubili în apă; se pot testa totuși, cel puțin în principiu, și compușii volatili și cei puțin solubili în apă.

Metoda este aplicabilă numai acelor compuși organici care nu sunt inhibitori pentru bacterii la concentrația folosită în test. În cazul în care compusul testat nu este solubil la concentrația testată, se pot folosi măsuri speciale, precum utilizarea dispersiei ultrasonice, pentru a obține o dispersie bună a compusului de testat.

Informațiile despre toxicitatea substanței chimice pot fi utile pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru selectarea unor concentrații adecvate la test.

1.2. DEFINIȚIE ȘI UNITĂȚI

CBO este cantitatea de oxigen dizolvat necesară pentru un volum specificat de soluție a substanței supusă procesului de oxidare biochimică în condiții definite.

Rezultatele se exprimă în grame de CBO pe gram de substanță.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Se recomandă folosirea unei substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea inoculului.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

O cantitate predeterminată de substanță, dizolvată sau dispersată într-un mediu adecvat bine aerat, este inoculată cu microorganisme și incubată la o temperatură constantă, definită, la întuneric.

CBO se determină prin diferența dintre concentrațiile de oxigen dizolvat la începutul și la sfârșitul testului. Durata testului este de minimum 5 zile și maximum 28 de zile.

Într-o testare paralelă se determină CBO pe o probă martor, care nu conține substanță de testat.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Determinarea CBO nu poate fi considerată ca o determinare valabilă a biodegradabilității unei substanțe. Acest test este considerat doar test de triere.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se prepară o soluție sau dispersie preliminară de substanță pentru a obține concentrația CBO compatibilă cu metoda folosită. Apoi, se determină CBO conform oricărei metode naționale sau internaționale standardizate.

▼B

2. **DATE ŞI EVALUARE**

CBO conținut în soluția preliminară se calculează conform metodei standardizate alese și se transformă în grame de CBO pe gram de substanță testată.

3. **RAPORT**

Trebuie consemnată metoda folosită.

Consumul biochimic de oxigen trebuie să fie o medie a cel puțin trei măsurători valabile.

Toate informațiile și observațiile importante pentru interpretarea rezultatelor trebuie consemnate, în special cu privire la impurități, starea fizică, efectele toxice și compoziția intrinsecă a substanței care ar afecta rezultatele.

Folosirea unui aditiv pentru inhibiția nitrificării biologice trebuie consemnată.

4. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Listă de metode standardizate, de exemplu:

NF T 90 -103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **DEGRADAREA – CONSUMUL CHIMIC DE OXIGEN**

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este determinarea consumului chimic de oxigen (CCO) al substanțelor organice solide sau lichide prin aplicarea oricărei metode standardizate, în condiții de laborator stabilite.

Informațiile privind formula substanței sunt utile în realizarea acestui test și pentru interpretarea rezultatului obținut (de exemplu, halogenuri, săruri feroase ale compușilor organici, compuși organici clorurați).

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Consumul chimic de oxigen este o măsură a oxidabilității unei substanțe, exprimat prin cantitatea echivalentă de oxigen a unui reactiv oxidant consumat de substanță în condiții de laborator stabilite.

Rezultatul se exprimă în grame de CCO pe gram de substanță.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Nu este necesar să se folosească substanțe de referință în toate cazurile în care se studiază o substanță nouă. Aceste substanțe se folosesc în primul rând pentru a calibra periodic metoda și pentru compararea rezultatelor atunci când se aplică altă metodă.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

O cantitate predeterminată de substanță, dizolvată sau dispersată în apă, se oxidează cu dicromat de potasiu, în prezența unui catalizator de argint (sulfat de argint) în mediu de acid sulfuric concentrat, cu reflux, timp de două ore. Dicromatul rezidual se determină prin titrare cu sulfat de amoniu și fier.

În cazul substanțelor care conțin clor se adaugă sulfat de mercur ([1]) pentru a reduce interferența acestuia.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Datorită modului arbitrar de determinare, CCO este un „indicator de oxidabilitate” și se folosește ca atare ca metodă practică pentru determinarea conținutul de substanță organică.

Clorurile pot interfera în acest test; agenții anorganici reducători sau oxidanți pot de asemenea să interfereze la determinarea CCO.

Unii compuși ciclici și multe substanțe volatile (de exemplu, acizi grași inferiori) nu sunt oxidați complet în acest test.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Se prepară o soluție sau dispersie preliminară de substanță pentru a obține CCO între 250 și 600 mg/l.

([1]) După folosire, soluțiile conținând săruri de mercur trebuie tratate pentru a evita pătrunderea mercurului în mediul înconjurător.

▼B

Observații:

În cazul substanțelor puțin solubile și nedispersabile se poate cântări o cantitate de substanță fin pulverizată sau lichidă, corespunzând la aproximativ 5 mg CCO, care se introduce în aparatul experimental cu apă.

CCO se determină mai ușor, deseori și în special în cazul substanțelor puțin solubile, printr-o variantă a metodei, în sistem închis cu egalizator de presiune (H. Kelkenberg, 1975). Prin această variantă a metodei, compușii care sunt determinați cu dificultate prin metoda convențională – de exemplu acid acetic – pot fi adesea determinați cu succes. Metoda nu dă rezultate bune, însă, în cazul piridinei. Dacă, în conformitate cu referința bibliografică 1, concentrația de dicromat de potasiu crește la 0,25 N (0,0416 M), devine mai ușoară cântărirea directă a 5-10 mg de substanță, ceea ce este esențial pentru determinarea CCO la substanțele puțin solubile în apă (referința 2).

În alte cazuri, CCO se determină apoi după orice metodă adecvată națională sau internațională standardizată.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

CCO conținut în vasul experimental se calculează după metoda standardizată aleasă și se convertește în grame de CCO pe gram de substanță.

3. **RAPORT**

Se consemnează metoda de referință folosită.

Consumul chimic de oxigen trebuie să fie media a cel puțin 3 măsurători. Trebuie prezentate toate informațiile și observațiile relevante pentru interpretarea rezultatelor, în special cu privire la impurități, starea fizică, proprietățile intrinseci ale substanței (dacă se cunosc) care ar putea afecta rezultatele.

Trebuie consemnată utilizarea sulfatului de mercur pentru a reduce la minim interferența clorurilor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, p. 146.

2. Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, p. 169.

Lista metodelor standardizate, de exemplu:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADAREA – DEGRADAREA ABIOTICĂ: HIDROLIZA CA O FUNCȚIE A PH-ULUI

1. METODĂ

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 111 (2004) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Substanțele chimice pot pătrunde în apele de suprafață prin următoarele căi: direct, prin pulverizare, prin spălare, prin sistemul de canalizare, prin depozitarea deșeurilor, prin deversări industriale, casnice sau agricole și prin depuneri din atmosferă. În apă, substanțele suferă procese chimice (de exemplu hidrolizare sau oxidare), procese fotochimice și/sau procese microbiologice de transformare. Această Orientare, bazată pe Orientările menționate la referințele 1, 2, 3, 4, 5, 6 și 7 existente, descrie o metodă de laborator prin care se evaluează transformarea prin hidroliză abiotică a substanțelor chimice în sistemele apoase, la o valoare a pH-ului găsită în mod normal în mediul înconjurător (pH = 4-9).

Experimentele sunt realizate pentru a determina (i) rata hidrolizării substanței test ca funcție a pH-ului și (ii) felul sau natura și ratele de formare și epurare a produșilor de hidroliză la care poate fi expus organismul. Asemenea studii pot fi necesare pentru substanțele chimice care pătrund în apă direct, sau care ajung în mediul înconjurător prin metodele descrise mai sus.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

A se vedea apendicele 2.

1.3. APLICABILITATEA METODEI

Această metodă este aplicabilă în general substanțelor chimice (marcate sau nu) pentru care este disponibilă o metodă analitică suficient de sensibilă și sigură. Este aplicabilă pentru compușii slab volatili sau nevolatili și care sunt suficient de solubili în apă. Testul nu trebuie aplicat substanțelor chimice puternic volatile din apă (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care, din această cauză, nu pot fi menținuți în soluție, în condițiile experimentale ale acestui test. Pentru substanțele cu solubilitate mică în apă, testul este dificil de realizat (8).

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Soluțiile apoase tampon sterile, cu valori diferite ale pH-ului (pH de 4, 7 și 9), sunt tratate cu substanța testată și incubate la întuneric, în condiții controlate de laborator (la temperatură constantă). După un interval adecvat de timp, soluțiile tampon sunt analizate atât pentru substanța testată, cât și pentru produșii de hidroliză. În cazul substanțelor de testare marcate (de exemplu cu ^{14}C), bilanțul maselor poate să fie calculat mai ușor.

Această metodă de testare este realizată secvențial, așa cum este arătat și explicat în apendicele 1. Fiecare secvență este declanșată de rezultatul celei anterioare.

▼B

1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

Rata de hidroliză poate fi măsurată cu ajutorul substanțelor marcate sau nemarcate. Deși pentru studierea procesului de hidroliză și pentru stabilirea bilanțului maselor, este preferat în general materialul marcat, totuși, în unele cazuri, acesta nu este absolut necesar. Este recomandată marcarea cu ^{14}C, însă este la fel de utilă și folosirea altor izotopi, cum ar fi ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Pe cât posibil, marcarea ar trebui făcută în porțiunea (porțiunile) cea mai stabilă a moleculei. De exemplu, dacă substanța testată are în structură un inel, este necesar ca marcarea să se facă la acest nivel. Dacă substanța testată conține două sau mai multe inele, sunt necesare studii separate pentru a evalua rezultatul marcării fiecărui inel în parte și pentru a obține informații adecvate despre formarea produșilor de hidroliză. Puritatea substanței testate trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înaintea desfășurării unui test de hidroliză, trebuie să fie disponibile următoarele informații despre substanța testată:

(a) solubilitatea în apă [Metoda de testare A.6];

(b) solubilitatea în solvenți organici;

(c) presiunea vaporilor [Metoda de Testare A.4] și/sau constanta lui Henry;

(d) coeficientul de partiție n-octanol/apă [Metoda de testare A.8];

(e) constanta de disociere (pKa) (Orientarea 112 a OCDE) (9);

(f) rata de fototransformare directă sau indirectă în apă, acolo unde este cazul.

Trebuie să fie disponibile metode analitice de cuantificare ale substanței testate și, dacă este relevant, metode de identificare și cuantificare ale produșilor de hidroliză în soluții apoase (a se vedea, de asemenea, punctul 1.7.2).

1.6. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Atunci când este posibil, substanțele de referință ar trebui utilizate pentru identificarea și cuantificarea produșilor de hidroliză prin metode spectroscopice, cromatografice sau prin alte metode sensibile adecvate.

1.7. CRITERII DE CALITATE

1.7.1. **Randamentul de recuperare**

Analizarea cel puțin a substanțelor tampon duplicate sau a produșilor lor de reacție rezultați imediat după adăugarea substanței testate oferă o primă concluzie asupra repetabilității metodei analitice și asupra uniformității procedurii pentru substanța experimentală. Randamentul de recuperare pentru stadiile mai avansate ale experimentelor este indicat de bilanțul maselor respectiv (când sunt folosite substanțe marcate). Pentru substanțele chimice marcate și nemarcate, randamentele de recuperare trebuie să aibă valori cuprinse între 90 % și 110 %. În cazul existenței dificultăților tehnice pentru atingerea acestor valori, un randament de 70 % este acceptat pentru substanțele chimice nemarcate, dar ar trebui oferite explicații suplimentare.

▼B

1.7.2. **Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei/metodelor analitice folosite pentru măsurarea în stadii avansate a substanței de testat și a produșilor de hidroliză poate fi verificată prin repetarea analizei aceleiași substanțe tampon (sau a produșilor ei de reacție), după ce s-a format o cantitate suficientă de produși de hidroliză pentru a putea fi măsurată.

Metoda analitică trebuie să fie suficient de sensibilă pentru cuantificarea substanței test la o concentrație de 10 % sau mai puțin din concentrația inițială. În anumite cazuri, metodele analitice ar trebui să fie suficient de sensibile pentru a măsura produșii de hidroliză reprezentând 10 % sau mai mult din substanța inițială (în orice moment al studiului) și până la 25 % sau mai puțin din concentrația maximă.

1.7.3. **Intervalele de încredere pentru cinetica hidrolizei**

Pentru toți coeficienții de regresie, constantele vitezei de reacție, timpii de înjumătățire și oricare alți parametri de cinetică (de exemplu DT_{50}) trebuie calculate și prezentate intervalele de încredere.

1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.8.1. **Aparatură și echipament**

Experimentul trebuie desfășurat în recipiente de sticlă (de exemplu tuburi de test, retorte mici) în condiții sterile, la întuneric dacă este necesar, cu excepția cazurilor în care informațiile preliminare (de exemplu coeficientul de partiție n-octanol/apă) au indicat că substanța testată este aderentă de sticlă. În asemenea cazuri, trebuie luate în considerare materialele alternative (cum ar fi teflonul). Problema aderenței la sticlă poate fi evitată și prin folosirea uneia sau mai multora dintre următoarele metode:

— determinarea masei substanței de testat și produșii de hidroliză absorbiți de recipientul testat;

— folosirea unei băi ultrasonice;

— asigurarea unei spălări pe bază de solvent a recipientelor de sticlă la fiecare interval de colectare a datelor;

— utilizarea produselor preparate;

— folosirea unei cantități crescute de cosolvent pentru adăugarea substanței de testat; dacă se folosește un cosolvent, acesta nu trebuie să hidrolizeze substanța de testat.

În mod normal, sunt necesare băi de apă termostatate cu sistem de vibrație sau incubatoare termostatate pentru incubarea diferitelor substanțe de testat.

Este necesară folosirea unui echipament de laborator standard, care să cuprindă în special următoarele:

— pH-metru;

▼B

— instrumente analitice cum ar fi echipament GC, HPLC, TLC, inclusiv sisteme adecvate de detectare pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a celor nemarcate sau a metodei de diluare izotopică inversă;

— instrumente folosite în scopul identificării (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR etc.);

— contor de scintilație lichidă;

— pâlnii separatoare pentru extracția lichid-lichid;

— instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a produșilor de reacție (de exemplu evaporator rotativ);

— dispozitiv de control al temperaturii (de exemplu baie de apă).

Reactanții chimici cuprind, de exemplu:

— solvenți organici, puri din punct de vedere chimic, cum ar fi hexanul, diclormetanul etc.;

— lichid de scintilație;

— soluție tampon (pentru detalii a se vedea punctul 1.8.3).

Toate recipientele din sticlă, apa pură și soluțiile tampon folosite în testele de hidroliză trebuie să fie sterilizate.

1.8.2. **Utilizarea substanței de testare**

Substanțele de testare trebuie folosite ca soluții apoase în diferite soluții tampon (a se vedea apendicele 3). Dacă este necesar pentru dizolvarea adecvată, este permisă folosirea unor cantități mici de solvenți care pot fi amestecați cu apa (cum sunt acetonitrilul, acetona, etanolul) în vederea aplicării și distribuției substanței testate, dar în mod normal nu ar trebui să se depășească 1 % v/v. Folosirea unei concentrații mai mari de solvent (de exemplu în cazul substanțelor de testare cu solubilitate mică în apă) nu este permisă decât atunci când se demonstrează că solventul nu are efect asupra hidrolizei substanței de testare.

Utilizarea unui produs preparat nu este recomandată în mod curent, deoarece nu se poate exclude că ingredientele de preparare pot influența procesul de hidroliză. Totuși, pentru substanțele de testare cu solubilitate mică în apă sau pentru substanțele aderente de sticlă (a se vedea punctul 1.8.1), folosirea substanțelor preparate constituie o alternativă adecvată.

Trebuie folosită o singură concentrație a substanței de testare; aceasta nu trebuie să depășească 0,01 M sau jumătate din concentrația de saturare (a se vedea apendicele 1).

▼B

1.8.3 **Soluții tampon**

Testul de hidroliză trebuie realizat la valori ale pH-ului de 4, 7 și 9. În acest scop, soluțiile tampon trebuie preparate folosind apă și substanțe chimice purificate. În apendicele 3 sunt prezentate câteva sisteme tampon folositoare. Trebuie avut în vedere că sistemele tampon pot influența rata de hidroliză; când acest lucru este observat trebuie folosit un alt sistem tampon ([1]).

PH-ul fiecărei soluții tampon trebuie să corespundă, cu o precizie de cel puțin 0,1, cu valoarea pH-ului măsurată de un pH-metru calibrat la temperatura cerută.

1.8.4. **Condiții de testare**

1.8.4.1. *Temperatura de testare*

Reacțiile de hidroliză din experiment trebuie efectuate la o temperatură constantă. În vederea extrapolării, este important ca temperatura să fie menținută la cel puțin ± 0,5 °C.

Dacă nu se cunoaște comportamentul hidrolitic al substanței test, trebuie efectuat un test preliminar (faza 1) la o temperatură de 50 °C. Testele cinetice de fază mai avansată ar trebui realizate la un minimum de trei temperaturi (incluzând testul la 50 °C), cu excepția cazului în care substanța este stabilă la hidroliză, așa cum s-a demonstrat în faza 1 a testului. Intervalul de temperatură sugerat este cuprins între 10 și 70 °C (preferabil cu utilizarea a cel puțin unei temperaturi sub 25 °C), care va include și temperatura raportată de 25 °C și cele mai multe dintre temperaturile întâlnite.

1.8.4.2. *Lumina și oxigenul*

Toate testele de hidroliză se vor desfășura prin folosirea unor metode adecvate care evită efectul fotolitic. Vor fi luate toate măsurile pentru evitarea oxigenului (de exemplu prin barbotarea heliului, a nitrogenului sau a argonului timp de 5 minute înaintea pregătirii soluției).

1.8.4.3. *Durata testului*

Testul preliminar trebuie să dureze 5 zile, în timp ce fazele mai avansate trebuie să se desfășoare fie până când hidroliza substanței test s-a produs în proporție de 90 %, fie timp de 30 de zile, în funcție de care din evenimente se produce primul.

1.8.5. **Realizarea testului**

1.8.5.1. *Testul preliminar (faza 1)*

Testul preliminar trebuie realizat la o temperatură de 50 ± 0,5 °C și la un pH de 4, 7 și 9. Dacă după 5 zile hidroliza s-a produs într-un procent mai mic de 10 % ($t_{0,5}$ la 25 °C > 1 an), substanța testată este considerată stabilă la hidroliză și nu mai este necesar niciun test suplimentar. Dacă se cunoaște că substanța este instabilă la temperatura mediului înconjurător ([2]), testul preliminar nu mai este necesar. Metoda analitică trebuie să fie suficient de precisă și sensibilă pentru a detecta reducerea cu 10 procente din concentrația inițială.

([1]) Mabey și Mill recomandă folosirea boratului și acetatului în locul fosfatului (11).

([2]) Astfel de informații pot veni din alte surse, precum informațiile despre hidroliza unor compuși cu structură similară, din literatură sau din alte teste de hidroliză semicantitativă cu substanțele experimentale într-un stadiu incipient de dezvoltare.

▼B

1.8.5.2. *Hidroliza substanțelor instabile (faza 2)*

Fazele avansate ale testului trebuie să fie realizate la valori ale pH-ului la care substanțele test au fost găsite instabile, după cum s-a arătat în testul preliminar de mai sus. Soluțiile tampon ale substanței de testat trebuie să fie incubate la temperaturile selectate. Pentru a testa comportamentul primar, fiecare soluție din reacție trebuie să fie analizată în intervalele de timp care asigură un minimum de șase puncte de reper normale separate ale hidrolizării între 10 % și 90 % ale substanței de testat. Replicarea fiecărei probe a testului (minim dublarea probelor conținute în vase separate de reacție) trebuie înlăturată, iar conținutul trebuie analizat la fiecare din cel puțin șase momente de eșantionare (pentru un minimum de douăsprezece puncte de reper replicate). Utilizarea unui singur eșantion de mărime de la care s-au îndepărtat părțile alicote ale soluțiilor experimentale la fiecare moment de eșantionare, este considerată neadecvată deoarece, în acest fel nu este permisă analizarea variabilității datelor și se poate ajunge la probleme de contaminare a soluțiilor testate. La finalul fazei avansate a testului (adică la hidrolizarea în procent de 90 % sau după 30 de zile) trebuie efectuate teste de confirmare a sterilității. Totuși, testele de sterilitate nu sunt necesare dacă nu s-a observat nicio degradare (adică transformare).

1.8.5.3. *Identificarea produșilor de hidroliză (faza 3)*

Orice produși majori de hidroliză, cel puțin cei care reprezintă > 10 % din doza inițială, trebuie identificați prin metode analitice adecvate.

1.8.5.4. *Teste opționale*

Pentru substanțele test instabile la hidroliză pot fi necesare teste suplimentare la alte valori ale pH-ului decât 4, 7 și 9. De exemplu, în scopuri fiziologice, un test în condiții mai acide (de exemplu pH de 1,2) poate fi necesar prin înlocuirea unei singure temperaturi relevante fiziologic (37 ^{o}C).

2. **DATE**

Cantitățile de substanță test și de produși de hidroliză trebuie date ca procente din substanța folosită inițial, iar acolo unde este cazul, ca mg/L pentru fiecare interval de eșantionare și pentru fiecare pH și temperatură din test. În plus, bilanțul maselor trebuie calculat ca procent din concentrația inițială, atunci când s-au folosit substanțe test marcate.

Trebuie realizată reprezentarea grafică a transformării logaritmice a concentrației substanței test în funcție de timp. Trebuie identificați orice produși majori de hidroliză, cel puțin cei care reprezintă > 10 % din doza inițială, iar transformarea logaritmică a concentrației lor trebuie reprezentată în aceeași manieră ca pentru substanța inițială, pentru a arăta ratele de formare și de declin.

▼B

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se pot obține determinări mai precise ale timpilor de înjumătățire sau ale DT_{50} prin folosirea unor modele cinetice adecvate. Timpii de înjumătățire și/sau valoarea DT_{50} (inclusiv marjele de eroare) trebuie raportate pentru fiecare valoare a pH-ului sau a temperaturii, împreună cu descrierea modelului folosit, ordinul cinetic și coeficientul de determinare (r^2). Acolo unde este cazul, aceste calcule trebuie să fie aplicate și asupra produșilor de hidroliză.

În cazul studierii vitezei de reacție desfășurate la temperaturi diferite, constantele vitezei de reacție (Kobs) ale hidrolizei cu cinetică de pseudo ordin I trebuie descrise în funcție de temperatură. Calculele trebuie să se bazeze atât pe separarea Kobs în constante ale vitezelor de reacție pentru hidroliza catalizată în mediu acid, neutru sau bazic (k_H, k_{neutru} și, respectiv k_{OH}), cât și pe ecuația Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

unde A_i și B_i sunt constantele de regresie pentru segment și respectiv pantă, ale liniilor de optimă ajustare, generate din regresia lineară ln k_i reprezentată în funcție de inversul temperaturii absolute în grade Kelvin (T) Prin folosirea ecuației Arrhenius pentru hidroliza catalizată în mediu acid, neutru sau bazic, se pot calcula constantele vitezei de reacție cu cinetică de pseudo ordin I, și astfel timpii de înjumătățire pentru alte temperaturi, pentru care determinarea directă a constantei vitezei de reacție nu este posibilă (10).

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Majoritatea reacțiilor de hidroliză sunt aparent reacții de ordinul I și, de aceea, timpii de înjumătățire sunt independenți de concentrație (a se vedea ecuația 4 din apendicele 2) Acest lucru permite de obicei aplicarea rezultatelor de laborator, determinate de la 10^{-2} la 10^{-3} M, în condițiile mediului înconjurător ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey și Mill au raportat câteva exemple de corespondență între vitezele de hidroliză atât în apă pură, cât și în apă naturală, pentru o varietate de substanțe chimice, cu condiția ca pH-ul și temperatura să fi fost măsurate.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța de testare:

— numele obișnuit, numele chimic, numărul CAS, structura chimică (indicându-se poziția în care a fost marcată, atunci când se folosesc substanțe marcate radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante (a se vedea punctul 1.5);

— puritatea (impuritățile) substanței experimentale;

— puritatea substanței de marcare pentru substanțele chimice marcate și activitatea molară (acolo unde este cazul).

▼B

— Soluțiile tampon:

— date și detalii despre preparare;

— soluțiile tampon și soluțiile apoase folosite;

— molaritatea și pH-ul soluțiilor tampon.

Condițiile de testare:

— date despre desfășurarea experimentelor;

— cantitatea de substanță de testare folosită;

— metodă și solvenți (tip și cantitate) folosiți pentru aplicarea substanței de testare;

— volumul soluțiilor tampon ale substanței de testare incubate;

— descrierea sistemelor de incubare folosite;

— pH-ul și temperatura în timpul experimentului;

— intervalele de eșantionare;

— metoda (metodele) de extracție;

— metode de cuantificare și identificare ale substanței de testare și ale produșilor de hidroliză în soluțiile tampon;

— număr de repetări.

Rezultate:

— repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice folosite;

— randamentele de recuperare (valorile procentuale pentru un experiment valabil sunt date în punctul 1.7.1);

— replicarea datelor și mijloacelor sub formă de tabel;

— bilanțul maselor în timpul și la sfârșitul experimentelor (când se folosesc substanțe test marcate);

— rezultatele testului preliminar;

— discuții și interpretarea rezultatelor;

— toate datele și cifrele originale.

Următoarele date sunt necesare doar în cazul în care viteza reacției de hidroliză este determinată:

— graficele concentrațiilor în funcție de timp pentru substanța de testare și, acolo unde este cazul, pentru produșii de hidroliză la fiecare valoare a pH-ului și a temperaturii;

— tabele cu rezultatele ecuației Arrhenius pentru temperaturi de 20 °C/25 °C, cu pH, constanta vitezei de reacție [ora^{-1} sau ziua^{-1}], timpii de înjumătățire sau DT_{50}, temperaturi [°C], inclusiv intervalele de încredere și coeficienții de corelație (r^2) sau informații similare;

— calea de hidroliză propusă.

▼B

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD (1981), Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

2. US-Environmental Protection Agency (1982), 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3. Agriculture Canada (1987), Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4. Uniunea Europeană (UE) (1995), Directiva 95/36/CE a Comisiei din 14 iulie 1995 de modificare a Directivei 91/414/CEE a Consiliului privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare. Apendicele V: Comportamentul în mediu.

5. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991), Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6. BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7. SETAC (1995), Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8. OECD (2000), Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

9. OECD (1993), Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

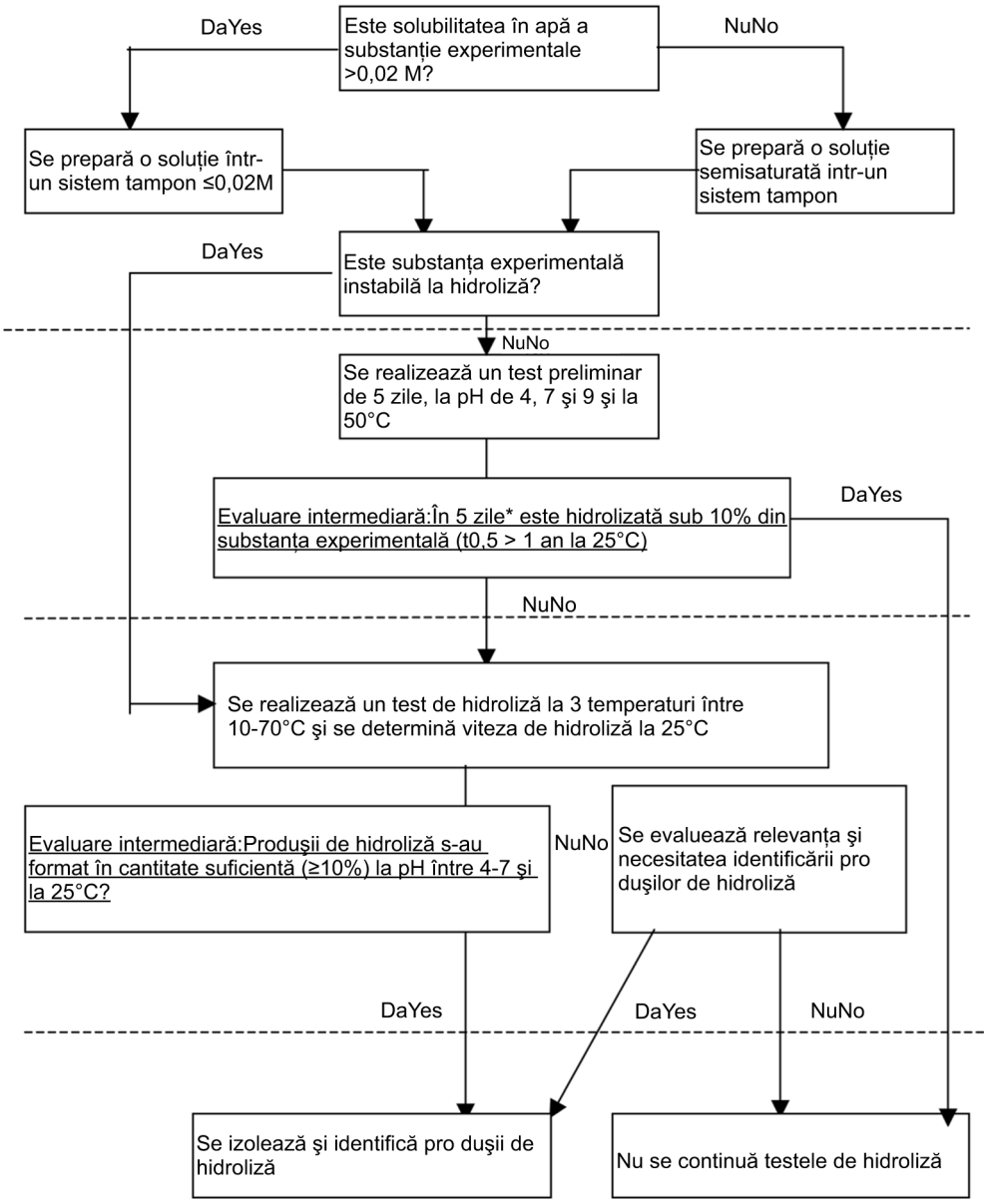
10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997), Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11. Mabey, W. and Mill, T. (1978), Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Apendicele 1

Schema secvențelor testului de hidroliză



* hidroliza a 10% din substanța experimentală la 50°C corespunde unui timp de înjumătățire de aprox. 30 zile, care corespunde unei valori de aprox. 1 an la 25°C.

▼B

Apendicele 2

Definiții și unități

Unitățile internaționale standard (SI) trebuie folosite în toate cazurile.

Substanța experimentală: orice substanță, fie compusul inițial, fie produșii de transformare relevanți.

Produși de transformare: toate substanțele care rezultă din reacțiile de transformare biotică sau abiotică a substanței experimentale.

Produși de hidroliză: toate substanțele care rezultă din reacțiile de hidroliză ale substanței experimentale.

Hidroliza se referă la reacția unei substanțe experimentale RX cu apa, cu schimbarea grupului X cu OH în timpul reacției:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Viteza cu care scade concentrația substanței RX în acest proces simplificat este dată de

viteza = k $[H_2O]$ [RX] reacție de ordin doi

sau

viteza = k [RX] reacție de ordinul întâi

depinzând de viteza pasului determinant. Deoarece apa este prezentă în exces comparativ cu substanța test, acest tip de reacție este descrisă de obicei ca reacție de pseudo ordin întâi, în care constanta observată a vitezei de reacție este dată de relația

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

și poate fi determinată din formula (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

unde:

t = timp

și C_0, C_t = concentrațiile RX la momentul 0 și t.

Unitățile de măsură ale acestei constante au dimensiunea $(timp)^{-1}$, iar timpul de înjumătățire al reacției (timpul necesar pentru ca 50 % din substanța RX să reacționeze) este dat de

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Timpul de înjumătățire: ($t_{0,5}$) este timpul necesar pentru hidroliza a 50 % din substanța test când reacția poate fi descrisă ca reacție cu cinetică de ordin întâi; este dependent de concentrație.

(*) Dacă graficul transformării logaritmice în funcție de timp nu arată o funcție liniară (egalată de o viteză de reacție de ordin întâi), atunci folosirea ecuației [3] nu este adecvată pentru determinarea constantelor vitezelor de reacție ale compușilor experimentali.

▼B

DT_{50} (timp de dispariție 50) este timpul în care concentrația substanței experimentale este redusă cu 50 %; este diferit de timpul de înjumătățire $t_{0,5}$ atunci când reacția nu se supune unei cinetici de ordinul întâi.

Determinarea constantei k la diferite temperaturi

Atunci când se cunosc constantele vitezei de reacție pentru două temperaturi, constantele pentru alte temperaturi se pot calcula folosind ecuația Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ sau } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graficul ln k în funcție de 1/T este o dreaptă având panta de – E/R

unde:

k = constanta vitezei de reacție măsurată la diferite temperaturi

E = energia de activare [kJ/mol]

T = temperatura absolută [K]

R = constanta gazului [8,314 J/mol.K]

Energia de activare este calculată prin analiza regresiei sau prin următoarea ecuație:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

unde: $T_2 > T_1$.

▼B

Apendicele 3

Sisteme tampon

A. **CLARK ŞI LUBS:**

Amestecuri tampon tip CLARK şi LUBS (*)

Compoziţie	pH
HCl 0,2 N şi KCl 0,2 N la 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	1,0
32,25 ml HCL + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. până la 100 ml	2,2
Biftalat monopotasic 0,1 M + HCl 0,1 N la 20 °C	
46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	2,2
39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	2,4
32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	2,6
26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	2,8
20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	3,0
14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	3,2
9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	3,4
5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	3,6
2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	3,8
Biftalat potasic 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C	
0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	4,0
3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	4,2
7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	4,4
12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	4,6
17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	4,8

(*) Valorile pH-ului din aceste tabele au fost calculate pornind de la măsurătorile potenţiale folosind ecuaţia Sörensen standard (1909). Valorile care corespund pH-ului sunt cu 0,04 unităţi mai mari decât valorile din tabel.

▼B

Compoziție	pH
23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	5,0
29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	5,2
35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	5,4
39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	5,6
43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	5,8
45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalat până la 100 ml	6,0

Amestecuri tampon tip CLARK și LUBS (Continuare)

Fosfat monopotasic 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C	
5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	6,0
8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	6,2
12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	6,4
17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	6,6
23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	6,8
29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	7,0
35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	7,2
39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	7,4
42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	7,6
45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	7,8
46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfat până la 100 ml	8,0
H_3BO_3 0,1 M în KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N la 20 °C	
2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	7,8
3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	8,0
5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	8,2
8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	8,4
12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	8,6
16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	8,8
21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	9,0
26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	9,4
36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	9,6
40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	9,8
43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml acid boric până la 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF ȘI VLEESCHHOUWER:**

Sisteme tampon citrat tip KOLTHOFF și VLEESCHHOUWER

Compoziție	pH
Citrat monopotasic 0,1 M și HCl 0,1 N la 18 °C (*)	
49,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	2,2
43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	2,4
36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	2,6
30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	2,8
23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	3,0
17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	3,2
10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	3,4
4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	3,6
Citrat monopotasic 0,1 M și NaOH 0,1 N la 18 °C (*)	
2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	3,8
9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	4,0
16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	4,2
23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	4,4
31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	4,6
39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	4,8
46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	5,0
54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	5,2
61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	5,4
68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	5,6
74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	5,8
81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrat până la 100 ml	6,0

(*) Se adaugă cristale mici de timol sau substanțe asemănătoare pentru a preveni creșterea mucegaiurilor.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Amestecuri borate tip SÖRENSEN

Compoziție		Sörensen 18 °C	Walbum, pH la		
ml Borax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
borax 0,05 M + HCl 0,1 N					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
borax 0,05 M + NaOH 0,1 N					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Amestecuri fosfate tip SÖRENSEN

Compoziție	pH
Fosfat monopotasic 0,0667 M + Fosfat disodic 0,0667 M la 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOXICITATEA LA RÂME**

TEST PE SOL ARTIFICIAL

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

În acest test de laborator substanța de testat se adaugă la un sol artificial în care se plasează râme timp de 14 zile. După această perioadă (și opțional după 7 zile) se examinează efectul letal al substanței pe râme. Testul reprezintă o metodă pentru determinarea pe termen relativ scurt a efectului substanțelor chimice pe râme prin absorbție cutanată și prin ingestie.

1.2. DEFINIȚIE ȘI UNITATE DE MĂSURĂ

CL_{50}: concentrația unei substanțe care este statistic responsabilă pe parcursul unei expuneri de moartea a 50 % din animalele expuse pe durata testului.

1.3. SUBSTANȚA DE REFERINȚĂ

Se folosește periodic o substanță de referință ca modalitate de a demonstra că sensibilitatea sistemului de testare nu s-a schimbat semnificativ.

Se recomandă ca substanță de referință cloracetamida de puritate analitică.

1.4. PRINCIPIUL TESTULUI

Solul fiind un mediu variabil, pentru acest test se folosește un sol artificial de argilă cu caracteristici definite cu atenție. Râmele adulte din specia *Eisenia foetida* (a se vedea nota din apendice) sunt ținute într-un sol artificial, definit, tratat cu diferite concentrații ale substanței de testat. Conținutul recipientelor este așezat pe o tavă după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului și se numără râmele care au supraviețuit fiecărei concentrații.

1.5. CRITERII DE CALITATE

Testul este conceput astfel încât să fie cât se poate de reproductibil cu privire la substratul de testare și organism. Dacă mortalitatea în loturile martor depășește 10 % la sfârșitul testului, acesta este invalidat.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. *Materiale*

1.6.1.1. Substrat de testare

Ca substrat de bază se folosește un sol artificial definit.

(a) Substratul de bază (procente exprimate în greutate uscată):

— 10 % mușchi de turbă (cât se poate de aproape de pH 5,5-6,0 și pe cât posibil fără resturi vizibile de plante și pământ);

▼B

— 20 % argilă caolinică, de preferat cu mai mult de 50 % caolinit;

— aproximativ 69 % nisip industrial de cuarț (mai mult de 50 % nisip fin cu dimensiunea particulelor de 0,05-0,2 mm). Dacă substanța nu se dispersează suficient în apă, trebuie păstrată o cantitate de 10 g nisip/recipient de testare pentru amestecare ulterioară cu substanța de testat;

— aproximativ 1 % carbonat de calciu ($CaCO_3$) pulbere, chimic pur, adăugat pentru a ajusta pH-ul la 6,0 ± 0,5.

(b) Substratul de testare

Substratul de testare conține substratul de bază, substanța de testat și apă deionizată.

Conținutul de apă este de aproximativ 25-42 % din greutatea uscată a substratului de bază. Conținutul de apă al substratului este determinat aducând la greutate constantă un eșantion, prin uscare la 105 °C. Criteriul cheie este acela că solul artificial trebuie udat așa încât apa să nu ajungă să băltească. Amestecarea se face cu grijă pentru a se obține o distribuție uniformă a substanței de testat și a substratului. Modul de introducere a substanței de testat în substrat trebuie trecut în raportul de testare.

(c) Substratul martor

Substratul martor conține substratul de bază și apă. Dacă se folosește un aditiv, se adaugă un substrat martor suplimentar care trebuie să conțină aceeași cantitate de aditiv.

1.6.1.2. Recipiente de testare

Recipiente de sticlă cu o capacitate de aproximativ 1 l (acoperite adecvat cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic cu perforații de aerisire) umplute cu o cantitate de substrat de testare umed sau substrat martor umed, echivalent cu 500 g de substrat uscat.

1.6.2. *Condiții de testare*

Recipientele trebuie păstrate în incinte climatizate la o temperatură de 20 ± 2 °C cu lumină continuă. Intensitatea luminii trebuie să fie de 400-800 de lucși.

Perioada de testare este de 14 zile, dar mortalitatea poate fi evaluată opțional la 7 zile de la începerea testului.

1.6.3. *Mod de operare*

Concentrațiile substanței de testat

Concentrațiile substanței de testat sunt exprimate ca raport între masa substanței și masa substratului de bază uscat (mg/kg).

Testul preliminar

Intervalul de concentrații care provoacă mortalități de 0-100 % se poate determina printr-un test preliminar, care să ofere informații despre intervalul de concentrații ce trebuie folosite în testul definitiv.

▼B

Substanța trebuie testată la următoarele concentrații: 1 000; 100; 10; 1 și 0,1 mg substanță/kg substrat de testare (greutate uscată).

Dacă urmează să se efectueze un test final, complet, un lot per concentrație și un lot pentru martorul netratat, fiecare cu câte 10 râme, pot fi suficiente pentru testul preliminar.

Testul definitiv

Rezultatele testului preliminar se folosesc pentru a selecta cel puțin 5 concentrații într-o serie geometrică din domeniul 0-100 % mortalitate, care diferă cu un raport constant de maximum 1,8.

Testele în care se folosesc aceste serii de concentrații trebuie să permită, cu cea mai mare precizie posibilă, estimarea valorii CL_{50} și a limitelor de încredere.

În testul definitiv se folosesc 4 loturi de testare per concentrație și 4 loturi martor netratate, fiecare cu 10 râme. Rezultatele acestor loturi replicate se prezintă ca medie, precizându-se deviația standard.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, aceste două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află CL_{50}.

Amestecul de substrat de bază și substanță testată

Dacă este posibil, substratul de testare trebuie preparat fără agenți suplimentari alții decât apa. Imediat înainte de începerea testului, o emulsie sau dispersie de substanță de testat în apă deionizată sau alt solvent se amestecă cu substratul de bază sau este pulverizată uniform peste el, cu un pulverizator de cromatografie fină sau similar.

Dacă este insolubilă în apă, substanța de testat se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform).

Se pot folosi numai agenți care se volatilizează rapid pentru a solubiliza, dispersa sau emulsiona substanța de testat. Substratul trebuie aerisit înainte de utilizare. Cantitatea de apă evaporată trebuie înlocuită. Martorul trebuie să conțină aceeași cantitate din orice aditiv.

Dacă substanța de testat nu este solubilă, dispersabilă sau emulsionabilă în solvenți organici, se amestecă 10 g de nisip de cuarț fin măcinat cu o cantitate de substanță de testat necesară pentru a trata 500 g de sol artificial uscat cu 490 g de substrat de testare uscat.

Pentru fiecare lot, o cantitate de substrat de testare umed echivalent cu 500 g greutate uscată se plasează în fiecare recipient din sticlă și 10 râme, care au fost ținute 24 de ore într-un substrat de bază umed similar, apoi clătite rapid, surplusul de apă fiind absorbit pe hârtie de filtru, sunt așezate pe substratul de testare.

▼B

Recipientele se acoperă cu capace de plastic, discuri sau foi de plastic perforate pentru a împiedica uscarea substratului și sunt ținute în condiții de testare 14 zile.

Evaluările trebuie făcute după 14 zile (opțional 7 zile) de la începerea testului. Substratul se întinde pe o placă de sticlă sau oțel inoxidabil. Râmele se examinează și se determină numărul de râme supraviețuitoare. Râmele se consideră moarte dacă nu răspund la un stimul mecanic ușor, aplicat în extremitatea anterioară.

Dacă examinarea are loc la 7 zile, recipientul se reumple cu substrat, iar râmele supraviețuitoare se așează pe același substrat de testare.

1.6.4. *Organisme de testare*

Organismele de testare trebuie să fie *Eisenia foetida* adulte (a se vedea nota din apendice) (în vârstă de cel puțin 2 luni, cu clitellum) cu o greutate umedă de 300-600 mg (pentru metoda de reproducere, a se vedea apendicele).

2. **DATE**

2.1. INTERPRETAREA ȘI EVALUAREA REZULTATELOR

Concentrațiile substanței de testat se raportează la procentele corespunzătoare de mortalitate a râmelor.

Dacă datele sunt adecvate, valoarea CL_{50} și limitele de încredere (p = 0,05) se determină prin metode standard (Litchfield și Wilcoxon, 1949, pentru metoda echivalentă). CL_{50} se exprimă în mg de substanță de testat pe kg de substrat de testare (greutate uscată).

În cazurile în care panta curbei de concentrație este prea mare pentru a permite calculul CL_{50}, este suficientă o estimare grafică a acestei valori.

Dacă două concentrații consecutive aflate în raport de 1,8 dau numai 0 % și 100 % mortalitate, cele două valori sunt suficiente pentru a indica intervalul în care se află CL_{50}.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— declarația de conformitate a testului cu criteriile de calitate menționate mai sus;

— testul realizat (testul preliminar și/sau testul definitiv);

— descrierea exactă a condițiilor de testare sau a declarației de conformitate a testului cu metoda; trebuie raportată orice abatere;

— descrierea exactă a modului în care s-a amestecat substanța de testat în substratul de bază;

— informații despre organismele testate (specia, vârsta, media și gama de greutate, condiții de păstrare și reproducere, furnizor);

▼B

— metoda folosită pentru determinarea CL_{50};

— rezultatele testului, inclusiv toate datele folosite;

— descrierea simptomelor observate sau a modificărilor de comportament ale organismelor testate;

— mortalitatea la loturile martor;

— CL_{50} sau cea mai mare concentrație testată fără mortalitate și concentrația minimă testată cu mortalitate de 100 % la 14 zile (și opțional 7 zile) de la începerea testului;

— trasarea curbei concentrație/răspuns;

— rezultatele obținute cu substanța de referință, fie în cadrul testului de față, fie în cel al unor teste anterioare de control al calității.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331

3. Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671

4. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments./. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

5. Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6. Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, „Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Apendice

Reproducerea și păstrarea râmelor înainte de testare

Pentru reproducerea organismelor, 30-50 de râme adulte sunt puse într-o cutie de reproducere, cu substrat proaspăt, și scoase după 14 zile. Aceste organisme se pot folosi ulterior pentru alte loturi de reproducere. Râmele scoase din coconi se folosesc pentru testare când ajung la maturitate (în condițiile cerute, după 2-3 luni).

Condiții de păstrare și reproducere

Incinta climatizată:	temperatura 20 ± 2 °C de preferință cu lumină continuă (intensitatea 400-800 de lucși).
Cutii de reproducere:	recipiente puțin adânci, cu o capacitate de 10-20 l.
Substrat:	*Eisenia foetida* se poate reproduce în diferite excremente de animale. Se recomandă să se folosească ca mediu de reproducere un amestec de 50 % volum turbă și 50 % bălegar de vacă sau cal. Mediul trebuie să aibă o valoare a pH-ului de 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu) și o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mmhos sau 0,5 % concentrație de sare). Substratul trebuie să fie umed, dar nu foarte ud. Se pot folosi alte metode de succes pe lângă metoda prezentată mai sus.

Notă: Unii taxonomiști au împărțit *Eisenia foetida* în două specii (Bouche, 1972). Acestea sunt morfologic similare, dar una, *Eisenia foetida foetida* prezintă dungi transversale tipice pe segmente, în timp ce a doua, *Eisenia foetida andrei* nu are aceste dungi și are o culoare roșiatică, cu pete. Dacă este posibil, se recomandă folosirea speciei *Eisenia foetida andrei*. Dacă este disponibilă metodologia necesară, se pot folosi alte specii.

▼B

C.9. **BIODEGRADARE**

METODA ZAHN-WELLENS

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Scopul acestei metode este evaluarea potențialului de biodegradabilitate totală al substanțelor organice nevolatile solubile în apă, atunci când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme într-un test static.

Pe materiile solide în suspensie poate avea loc adsorbția fizico-chimică, iar acest aspect trebuie luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea punctul 3.2).

Substanțele de studiat se folosesc în concentrații corespunzătoare valorilor COD în intervalul 50-400 mg/l, sau valorilor CCO în intervalul 100-1 000 mg/l (COD = carbon organic dizolvat; CCO = consum chimic de oxigen). Aceste concentrații relativ mari garantează o bună fiabilitate analitică. Compușii cu proprietăți toxice pot întârzia sau inhiba procesul de degradare.

În această metodă se folosește măsurarea concentrației de carbon organic dizolvat sau a consumului chimic de oxigen pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanței de testat.

Folosirea simultană a unei metode analitice specifice permite evaluarea biodegradabilității primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda este aplicabilă numai acelor substanțe organice testate care la concentrația folosită în test:

— sunt solubile în apă în condițiile de testare;

— au o presiune a vaporilor neglijabilă în condițiile de testare;

— nu sunt inhibitoare pentru bacterii;

— sunt adsorbite în sistemul de testare numai în cantități limitate;

— nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale compusului testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre acțiunea toxică a substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru selecția concentrațiilor testate corespunzătoare.

▼B

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Gradul de degradare atins la sfârșitul testului se raportează ca „Biodegradabilitate în testul Zahn-Wellens”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

unde:

D_T = gradul de biodegradare exprimat în % la momentul T,

C_A = valori COD sau (CCO) în amestecul testat, măsurate la trei ore după începerea testului (mg/l) (COD = carbon organic dizolvat, CCO = consum chimic de oxigen),

C_T = valori COD sau CCO în amestecul testat la momentul prelevării probelor (mg/l),

C_B = valori COD sau CCO ale probei martor la momentul prelevării probelor (mg/l),

C_{BA} = valorile COD sau CCO ale probei martor, măsurate la trei ore de la începerea testului (mg/l).

Gradul de degradare se rotunjește la cel mai apropiat procent întreg.

Procentul de degradare se exprimă ca procent de îndepărtare a COD (sau CCO) din substanța de testat.

Diferența dintre valoarea măsurată după trei ore și valoarea inițială calculată sau, de preferință, măsurată poate furniza informații utile cu privire la eliminarea substanței (a se vedea punctul 3.2 – Interpretarea rezultatelor).

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

În anumite cazuri, când se studiază substanțe noi, substanțele de referință pot fi utile; cu toate acestea, nu se pot recomanda încă substanțe de referință specifice.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Nămolul activ, substanțe nutritive minerale și substanța de testat – ca singură sursă de carbon în soluția apoasă – se introduc împreună într-un recipient din sticlă cu o capacitate de 1-4 l, prevăzut cu un dispozitiv de agitare și un aerator. Amestecul se agită și se aerează la 20-25 °C, în condiții de iluminare difuză sau într-o incintă întunecată, timp de până la 28 de zile. Procesul de degradare se monitorizează prin determinarea valorilor COD (sau CCO) în soluție filtrată, zilnic sau la alte intervale egale de timp adecvate. Raportul dintre COD (sau CCO) eliminat după fiecare interval și valoarea constatată la trei ore după începerea testului se exprimă ca procent de biodegradare și servește ca măsură a gradului de degradare în acel moment. Procentele se reprezintă grafic în funcție de timp, formând curba de biodegradare.

Atunci când se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările în concentrația moleculei primare datorate biodegradării (biodegradabilitate primară).

▼B

1.5. CRITERII DE CALITATE

Reproductibilitatea acestui test s-a dovedit a fi satisfăcătoare în cadrul unui test de comparație interlaboratoare.

Sensibilitatea metodei este determinată în mare măsură de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și nivelul compusului de testat în soluție.

1.6. DESCRIEREA MODULUI DE OPERARE

1.6.1. *Pregătire*

1.6.1.1. Reactivi

Apa de testare: apă potabilă cu conținut de carbon organic < 5 mg/l. Concentrația de ioni de magneziu și calciu, luate împreună, nu trebuie să depășească 2,7 mmol/l, altfel este necesară o diluare adecvată cu apă deionizată sau distilată.

Acid sulfuric, puritate analitică (p.a.)	50 g/l
Soluție de hidroxid de sodiu p.a.	40 g/l
Soluție nutritivă minerală: dizolvare într-un litru de apă deionizată:	
Clorură de amoniu, NH_4Cl, p.a.	38,5 g
Dihidrogenofosfat de sodiu, $NaH_2PO_4.2H_2O$ p.a.:	33,4 g
Dihidrogenofosfat de potasiu, KH_2PO_4 p.a.:	8,5 g
Dipotasiu mono-hidrogen fosfat K_2HPO_4, p.a.:	21,75 g

Amestecul servește atât ca substanță nutritivă, cât și ca soluție tampon.

1.6.1.2. Aparatură

Recipiente din sticlă cu o capacitate de 1-4 l (de exemplu, recipiente cilindrice).

Dispozitiv de agitare cu agitator din sticlă sau metal, pe un ax adecvat (agitatorul trebuie să se rotească la aproximativ 5-10 cm deasupra bazei recipientului). Se poate folosi, alternativ, un agitator magnetic cu tijă lungă de 7-10 cm.

Tub de sticlă cu diametrul interior de 2-4 mm, folosit pentru a introduce aer. Deschiderea tubului trebuie să fie de aproximativ 1 cm înălțime de la baza recipientului.

Centrifugă (aproximativ 3 550 g).

Ph-metru.

Aparat pentru măsurarea oxigenului dizolvat.

Filtre de hârtie.

▼B

Aparat de filtrare cu membrană.

Membrane de filtrare, cu dimensiunea porilor de 0,45 μm. Membranele de filtrare sunt adecvate dacă nu elimină carbon și nu adsorb substanța în faza de filtrare.

Echipament analitic pentru determinarea conținutului de carbon organic și a consumului chimic de oxigen.

1.6.1.3. Pregătirea inoculului

Nămolul activ, provenit dintr-o stație de epurare biologică, se spală prin centrifugare (repetată) sau decantare în apa de testare (a se vedea mai sus).

Nămolul activ trebuie să fie în stare corespunzătoare. Acest nămol se poate preleva de la o stație de epurare a apei uzate aflată în bună stare de funcționare. Pentru a obține cât mai multe specii sau sușe bacteriene diferite, este preferabilă amestecarea de inocul provenit din diferite surse (de exemplu, diferite stații de epurare, extracte de sol, apă de râu etc.). Amestecul trebuie tratat conform descrierii de mai sus.

Pentru verificarea activității nămolului activ, a se vedea „Controlul funcțional” de mai jos.

1.6.1.4. Pregătirea soluțiilor de testare

În recipientul de testare se adaugă: 500 ml apă de testare, 2,5 ml/l soluție nutritivă minerală, nămol activ într-o cantitate care să corespundă cu 0,2-1,0 g/l substanță uscată în amestecul final. Se adaugă suficientă soluție mamă de substanță de testat, astfel încât să se obțină în amestecul final o concentrație COD de 50-400 mg/l. Valorile CCO corespunzătoare sunt de 100-1 000 mg/l. Se adaugă apă până la un volum total de 1-4 l. Alegerea volumului total depinde de numărul de probe ce trebuie prelevate pentru determinările COD sau CCO și de volumele necesare pentru metoda analitică.

În mod normal, un volum de 2 litri poate fi considerat satisfăcător. Pentru fiecare serie de teste se prepară în paralel cel puțin un recipient cu probă martor; acesta conține numai nămol activ și soluție nutritivă minerală completată cu apă la același volum total ca în recipientele de testare.

1.6.2. *Mod de operare*

Recipientele de testare se agită cu agitatoare magnetice sau cu elice, în condiții de iluminare difuză, sau într-o incintă întunecată, la 20-25 ^{o}C. Aerarea se face cu aer comprimat, filtrat printr-un tampon de vată și, dacă este necesar, printr-un balon de spălare. Nămolul nu trebuie să se decanteze, iar concentrația de oxigen nu trebuie să scadă sub 2 mg/l.

Valoarea pH-ului se verifică periodic (de exemplu, zilnic) și, dacă este necesar, se ajustează la pH 7-8.

▼B

Pierderile prin evaporare se completează chiar înaintea fiecărei prelevări de probe, cu apă deionizată sau distilată în cantitățile necesare. O bună metodă este marcarea nivelului lichidului din recipientul de testare înainte de începerea testului. Noi marcaje se fac după fiecare prelevare de probe (fără aerare și amestecare). Primele probe se prelevează întotdeauna după trei ore de la începerea testului, pentru a se decela adsorbția substanței de testat pe nămolul activ.

Eliminarea substanței de testat este urmată de determinări COD sau CCO făcute zilnic sau la alte intervale egale. Probele din recipientul de testare și proba martor sunt filtrate printr-o hârtie de filtru spălată atent. Primii 5 ml de soluție filtrată se îndepărtează. Nămolurile greu de filtrat se pot înlătura anterior prin centrifugare timp de 10 minute. Determinările COD și CCO se fac cel puțin în duplicat. Testul durează 28 de zile.

Notă: Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtrele cu membrană. Acestea nu trebuie să elimine sau să adsoarbă nicio substanță organică.

Controlul funcțional al nămolului activ

Pentru fiecare serie de teste, trebuie studiat în paralel un recipient ce conține o substanță cunoscută, astfel încât să se poată verifica capacitatea funcțională a nămolului activ. S-a observat că dietilenglicolul este util în acest scop.

Adaptare

Dacă analizele se efectuează la intervale relativ scurte (de exemplu, zilnic) adaptarea poate fi recunoscută în mod evident din curba de degradare (a se vedea figura 2). Din această cauză, testul nu trebuie să înceapă imediat înainte de sfârșitul săptămânii.

Dacă adaptarea are loc la sfârșitul perioadei, testul poate fi prelungit până când degradarea s-a încheiat.

Notă: Dacă sunt necesare cunoștințe mai ample despre comportamentul nămolului activ, același nămol activ se tratează din nou cu aceeași substanță de testat în conformitate cu metoda de mai jos:

Se oprește dispozitivul de agitare și aeratorul și se lasă nămolul activ să decanteze. Se elimină supernatantul, se umple cu până la 2 litri cu apă, se agită 15 minute și se lasă să decanteze din nou. După ce se elimină din nou supenatantul, cu nămolul rămas se repetă testul cu același compus în conformitate cu punctele 1.6.1.4 și 1.6.2 de mai sus. Nămolul activ poate fi izolat și prin centrifugare în loc de decantare.

Nămolul adaptat poate fi amestecat cu nămol proaspăt într-o concentrație de 0,2-1 g substanță uscată pe litru.

▼B

Mijloace analitice

În mod normal, probele se filtrează printr-o hârtie de filtru spălată atent (pentru spălare se folosește apă deionizată).

Probele care rămân tulburi se filtrează prin filtre cu membrană (0,45 μm).

Concentrația COD se determină pe probe duplicate din eșantioanele filtrate (primii 5 ml sunt înlăturați) cu ajutorul analizorului TOC (*total organic carbon*). Dacă filtratul nu poate fi analizat în aceeași zi, acesta trebuie păstrat în frigider până în ziua următoare. Nu se recomandă o depozitare mai îndelungată.

Concentrația CCO se determină în proba filtrată prin metoda analitică CCO inițiată de procedura descrisă în referința bibliografică 2 de mai jos.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

Concentrațiile COD și/sau CCO se determină cel puțin de două ori pe probe conform punctului 1.6.2 de mai sus. Degradarea la momentul T se calculează conform formulei (cu definiții) date la punctul 1.2 de mai sus.

Gradul de degradare se rotunjește la procentul întreg cel mai apropiat. Gradul de degradare atins la sfârșitul testului constituie „biodegradabilitatea Zahn Wellens”.

Notă: Dacă are loc o degradare completă înainte de expirarea duratei testului, iar acest rezultat este confirmat de o a doua analiză efectuată în ziua următoare, testul poate fi încheiat.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— concentrația inițială a substanței;

— toate celelalte informații și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință, după caz, și proba martor;

— concentrația după trei ore;

— curba de biodegradare cu descriere;

— data și locul de unde s-a prelevat nămolul activ, stadiul de adaptare, concentrația folosită etc.;

— argumentele științifice pentru orice modificare a metodei de testare.

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Eliminarea COD (CCO) care are loc treptat după zile sau săptămâni indică faptul că substanța de testat se biodegradează.

▼B

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate să joace un rol în unele cazuri și acest lucru este indicat de existența unei eliminări complete sau parțiale de la început, în primele trei ore, iar diferența dintre martor și supernatantul de testare rămâne la un nivel neașteptat de scăzut.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste suplimentare.

În acest scop există mai multe metode, însă cea mai convingătoare este utilizarea supernatantului sau a nămolului ca agent de inoculare într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care duc la o eliminare avansată neadsorbtivă a COD (CCO) în acest test trebuie considerate ca potențial biodegradabile. Eliminarea parțială, neadsorbtivă, arată că substanța chimică este cel puțin biodegradabilă într-o anumită măsură. Eliminările reduse sau nule ale COD (CCO) se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat, acest lucru fiind indicat de liză și pierderea de nămol din care rezultă supernatanți tulburi. Testul se repetă cu o concentrație mai scăzută de substanță de testat.

Folosirea unei metode analitice specifice pentru compusul de testat sau a unei substanțe de testat marcate cu ^{14}C permite o sensibilitate mai mare. În cazul compusului marcat cu ^{14}C, recuperarea $^{14}CO_2$ confirmă că biodegradarea a avut loc.

Dacă rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, trebuie să se furnizeze, în măsura în care este posibil, o explicație cu privire la modificarea structurii chimice care duce la diminuarea răspunsului substanței inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut de la proba martor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decision of the Council (81) 30 final.

2. Anexa V C.6. *Degradarea – Consumul chimic de oxigen*. Directiva 92/69/CEE a Comisiei, Jurnalul Oficial al Comunităților Europene L 383, 29.12.1992, p. 1.

▼B

Apendice

EXEMPLU DE EVALUARE

Compus organic:	4-acid etoxibenzoic
Concentrația teoretică:	600 mg/l
COD teoretic:	390 mg/l
Inocul	instalația de epurare a apei uzate …
Concentrație:	1 g material uscată/l
Adaptare:	neadaptat
Analiza:	determinarea DOC
Cantitatea de probă:	3 ml
Substanța martor:	dietilenglicol
Toxicitatea compusului:	niciun efect toxic sub 1 000 mg/l Metoda utilizată: test cu tuburi de fermentație

Durata testului	Substanța martor				Substanța de testat		
	Proba martor DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	DOC net mg/l	Degradare %	DOC ([1]) mg/l	DOC net mg/l	Degradare %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ore	4,0	298,0	294,0	2,0	371,6	367,6	6
1 zi	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 zile	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 zile	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 zile	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 zile	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 zile	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 zile	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 zile	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Valori medii ale determinărilor efectuate de trei ori.

▼B

Figura 1

Exemple de curbe de biodegradabilitate

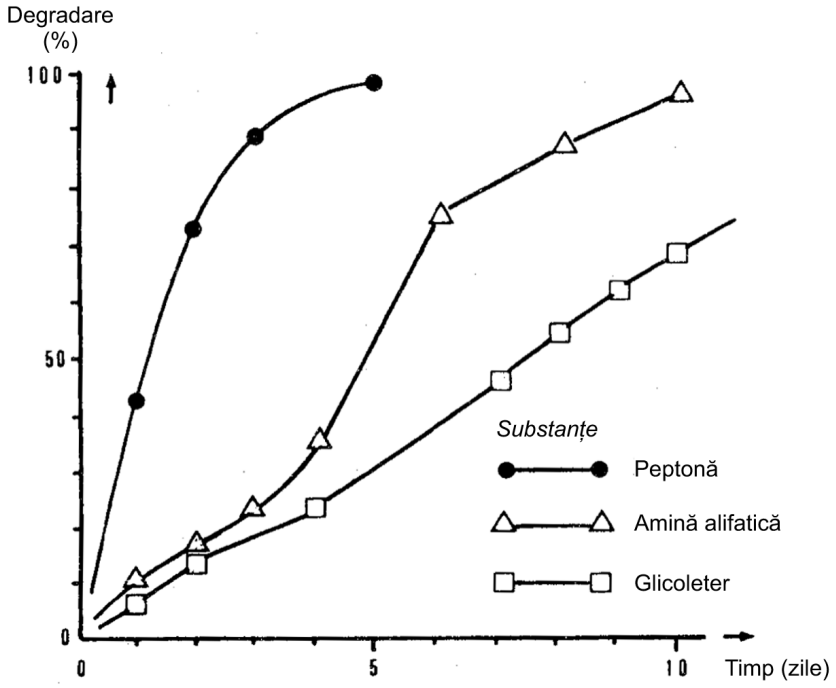
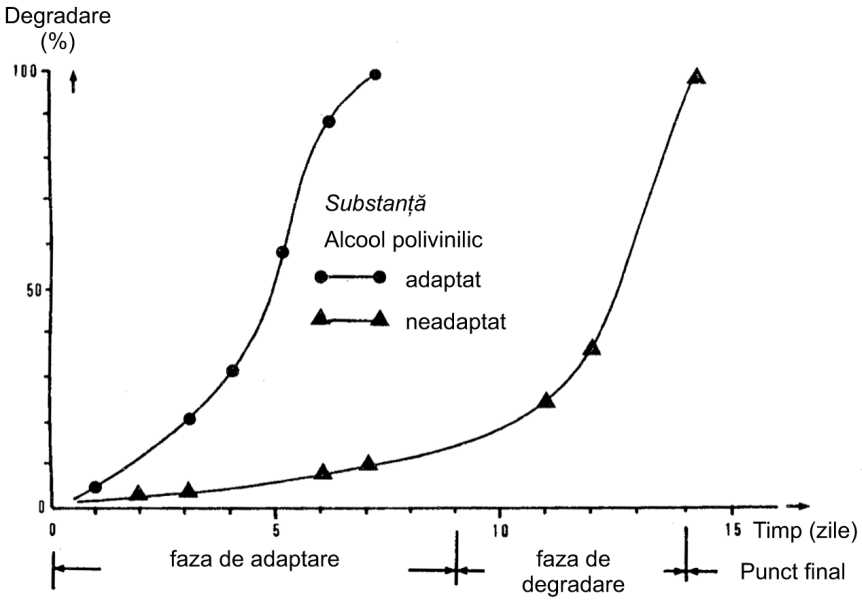


Figura 2

Exemple de adaptare a nămolului



▼M4

C.10. **TEST DE SIMULARE – TRATAREA AEROBĂ A APELOR UZATE: C.10-A: UNITĂȚI CU NĂMOL ACTIV – C.10-B: BIOPELICULE**

C.10-A: Unități cu nămol activ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 303 (2001) a OCDE. În anii 1950 s-a ajuns la concluzia că agenții tensioactivi nou introduși produceau spumare excesivă în stațiile de epurare a apei și în râuri. Aceștia nu au fost eliminați complet prin tratarea aerobă și în unele cazuri au limitat eliminarea altor materii organice. Această situație a determinat mai multe analize privind modul în care agenții tensioactivi ar putea fi eliminați din apele uzate și pentru a vedea dacă noile substanțe chimice produse de industrie se pretează pentru tratarea apelor uzate. În acest scop, s-au utilizat unități model care reprezintă cele două tipuri principale de tratare biologică aerobă a apelor uzate (nămol activ și filtrare cu stropire sau percolare). Ar fi fost nepractic și foarte costisitor să se distribuie fiecare substanță chimică nouă și să se monitorizeze instalațiile de epurare de mari dimensiuni, chiar și pe plan local.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

Unități cu nămol activ

2. Modelele de unități cu nămol activ au fost descrise ca având dimensiuni de la 300 ml până la circa 2 000 ml. Unele modele au reprodus îndeaproape instalații industriale, cu rezervoare de decantare a nămolului, nămolul decantat fiind pompat înapoi în vasul de aerare, în timp ce altele nu aveau instalații de decantare, de exemplu Swisher (1). Dimensiunea aparatului este un compromis; pe de o parte, trebuie să fie suficient de mare pentru o funcționare mecanică reușită și pentru a furniza un volum suficient de probe fără să afecteze funcționarea, iar pe de altă parte nu trebuie să fie atât de mare încât să necesite spațiu și materiale excesive.

3. Două tipuri de aparate care au fost utilizate pe scară largă și cu rezultate satisfăcătoare sunt unitățile Husmann (2) și unitățile de tip „vas poros” (3) (4), utilizate mai întâi în studiul agenților tensioactivi; acestea sunt descrise în această metodă de testare. Au mai fost utilizate și alte tipuri de unități cu rezultate satisfăcătoare, de exemplu unitățile Eckenfelder (5). Din cauza costului relativ ridicat și a efortului de aplicare a acestui test de simulare, s-au investigat în paralel teste de screening mai simple și mai ieftine, care acum sunt integrate în capitolul C.4 A-F din prezenta anexă (6). Experiența cu mulți agenți tensioactivi și alte substanțe chimice a arătat că cele care treceau testele de screening (ușor biodegradabile) se degradau și în testul de simulare. Unele din cele care nu au trecut testele de screening au trecut testele de biodegradabilitate intrinsecă [capitolul C.12 (7) și capitolul C.19 (8) din prezenta anexă], dar numai unele din acest al doilea grup au fost degradate în testul de simulare, în timp ce acele substanțe chimice care nu au trecut testele de biodegradabilitate intrinsecă nu s-au degradat în testele de simulare (9) (10) (11).

4. În unele scopuri sunt suficiente testele de simulare efectuate în cadrul unui singur set de condiții de funcționare; rezultatele sunt exprimate ca eliminare procentuală a substanței chimice testate sau a carbonului organic dizolvat (COD). Această metodă de testare oferă o descriere a unui astfel de test. Totuși, spre deosebire de versiunea anterioară a prezentului capitol, care descria un singur tip de aparat de tratare a apelor uzate sintetice în

▼M4

regimul cu instalații cuplate, care utiliza o metodă relativ brută a surplusului de nămol, acest text prezintă o serie de variații. Sunt descrise alternative la tipul de aparat, modul de funcționare, eliminarea surplusului de ape uzate și nămol. Prezentul text respectă îndeaproape textul din ISO 11733 (12), care a fost verificat cu minuțiozitate în timpul pregătirii sale, cu toate că metoda nu a fost supusă unui test de comparare interlaboratoare.

5. În alte scopuri, concentrația în efluent a substanței chimice testate trebuie să fie cunoscută cu mai multă precizie, de aceea este nevoie de o metodă mai extinsă. De exemplu, rata de pierdere a surplusului de nămol trebuie să fie controlată mai precis pe parcursul fiecărei zile și pe întreaga perioadă de testare, iar unitățile trebuie să funcționeze la mai multe rate de pierdere. Pentru o metodă cu adevărat completă, testele ar trebui să fie efectuate, de asemenea, la două sau trei temperaturi diferite: o astfel de metodă este descrisă de Birch (13) (14) și sintetizată în apendicele 6. Totuși, cunoștințele actuale sunt insuficiente pentru a decide care dintre modelele cinetice pot fi aplicate la biodegradarea substanțelor chimice în tratarea apelor uzate și în general în mediul acvatic. Aplicarea cineticii Monod, indicată ca exemplu în apendicele 6, se limitează la substanțele chimice prezente într-o concentrație de cel puțin 1 mg/l, dar în opinia unor specialiști chiar și acest lucru rămâne de demonstrat. Testele la concentrații care reflectă mai îndeaproape pe cele din apele uzate sunt indicate în apendicele 7, dar astfel de teste, ca și cele din apendicele 6, sunt incluse în apendice, fără să fie prezentate ca metode de testare separate.

Filtre

6. S-a acordat mult mai puțină atenție filtrelor de percolare utilizate ca model, probabil pentru că ocupă mai mult spațiu și sunt mai puțin compacte decât modelele de instalații cu nămol activ. Gerike *et al.* au dezvoltat unități de filtrare cu percolare și le-au exploatat în regim cu instalații cuplate (15). Aceste filtre erau destul de mari (înălțime 2 m; volum 60 l) și pentru fiecare era nevoie de un debit de ape uzate de 2 l/h. Baumann *et al.* (16) au simulat filtrele de percolare prin inserarea de fâșii de material din poliester tip „fleece” în tuburi de 1 m lungime (diametru interior 14 mm), după scufundarea fâșiilor timp de 30 de minute în nămol activ concentrat. Alimentarea cu substanța chimică testată, ca unică sursă de C într-o soluție de săruri minerale, se făcea printr-un tub vertical, iar biodegradarea era evaluată pe baza măsurării COD în efluent și a CO_2 în gazul evacuat.

7. Biofiltrele au fost simulate în alt mod (15); suprafețele interioare ale tuburilor rotative, înclinate la un unghi mic față de orizontală, au fost alimentate cu ape uzate (circa 250 ml/h), cu și fără substanța chimică testată specifică, iar efluenții colectați au fost analizați pentru COD și/sau substanța chimică specifică testată.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Această metodă este concepută pentru a determina eliminarea și biodegradarea primară și/sau finală a substanțelor chimice organice solubile în apă de către microorganisme aerobe, într-un sistem de testare cu funcționare continuă, care simulează procesul cu nămol activ. Un mediu organic ușor biodegradabil și substanța chimică organică testată reprezintă sursele de carbon și energie pentru microorganisme.

9. Două unități de testare cu funcționare continuă (instalații cu nămol activ sau vase poroase) funcționează în paralel, în condiții identice, care sunt alese pentru a corespunde scopului testului. În mod normal, timpul mediu de retenție hidraulică este de 6 h iar vârsta medie a nămolului (timpul de retenție a nămolului) este de 6 până la 10 zile. Nămolul este înlăturat prin una din cele două metode, substanța chimică testată se adaugă, în mod normal, la o concentrație între 10 mg/l de carbon organic dizolvat (COD) și 20 mg/l COD, la influentul (mediul organic) numai uneia dintre unități. A doua unitate este utilizată ca unitate de control pentru determinarea biodegradării mediului organic.

▼M4

10. În probele prelevate frecvent din efluenți se determină COD, de preferință, sau consumul chimic de oxigen (CCO), împreună cu concentrația substanței chimice testate (dacă este nevoie) prin analiză specifică, în efluentul de la unitatea care primește substanța chimică testată. Se consideră că diferența dintre concentrațiile din efluenți ale COD sau CCO în unitățile de testare și de control este datorată substanței chimice testate sau metaboliților săi organici. Această diferență este comparată cu concentrația de COD sau CCO în influent datorată substanței chimice testate adăugate, pentru a determina eliminarea substanței chimice testate.

11. În mod normal, biodegradarea poate fi deosebită de bioadsorbție prin examinarea atentă a curbei eliminare-timp și în general poate fi confirmată prin aplicarea unui test pentru biodegradare rapidă, utilizând un inocul aclimatizat din unitatea care primește substanța chimică testată.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

12. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice testate. În mod normal, substanțele chimice volatile și insolubile nu pot fi testate fără a se lua măsuri speciale de precauție (a se vedea apendicele 5). Trebuie să se cunoască și structura chimică sau cel puțin formula empirică pentru a calcula valorile teoretice și/sau pentru a verifica valorile măsurate ale parametrilor, de exemplu consumul teoretic de oxigen (CTO), carbonul organic dizolvat (COD) și consumul chimic de oxigen (CCO).

13. Informațiile legate de toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (a se vedea apendicele 4) pot fi utile pentru alegerea concentrațiilor de testare adecvate și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor scăzute de biodegradare.

NIVELURI DE TRECERE

14. În aplicarea originală a acestui test de simulare (de confirmare) la biodegradarea primară a agenților tensioactivi este necesară înlăturarea a mai mult de 80 % din substanța chimică specifică înainte ca agentul tensioactiv să poată fi comercializat. În cazul în care nu se atinge valoarea de 80 %, testul de simulare (de confirmare) poate fi aplicat, iar agentul tensioactiv se poate comercializa numai dacă se înlătură mai mult de 90 % din substanța chimică specifică. În general, la substanțele chimice nu se pune problema de a trece sau a nu trece testul, iar valoarea eliminării procentuale obținute poate fi utilizată în calcule aproximative ale concentrației probabile în mediu, care urmează să fie utilizate în evaluarea riscurilor implicate de substanțele chimice. Rezultatele tind să urmeze un tipar de tipul „totul sau nimic”. Într-o serie de studii privind substanțe chimice pure s-a constatat că procentul de eliminare a COD era > 90 % în mai mult de trei sferturi și > 80 % în peste 90 % din substanțele chimice, ceea ce a indicat un grad semnificativ de biodegradabilitate.

15. Relativ puține substanțe chimice (de exemplu, agenți tensioactivi) sunt prezente în apele uzate în concentrațiile (circa 10 mg C/l) utilizate în acest test. La aceste concentrații, unele substanțe chimice pot fi inhibitoare, în timp ce cinetica eliminării altor substanțe poate fi diferită la concentrații scăzute. O evaluare mai precisă a degradării s-ar putea face cu ajutorul unor metode modificate, utilizând concentrații de substanță chimică testată realist scăzute, iar datele culese ar putea fi utilizate pentru calculul constantelor cinetice. Totuși, tehnicile experimentale necesare nu au fost încă pe deplin validate și nici nu s-au stabilit modelele cinetice care descriu reacțiile de biodegradare (a se vedea apendicele 7).

▼M4

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

16. Pentru a asigura executarea corectă a procedurii experimentale, ocazional este util ca analiza substanțelor chimice testate să se facă simultan cu testarea unor substanțe chimice cu comportament cunoscut. Printre aceste substanțe se numără acidul adipic, 2-fenil-fenolul, 1-naftolul, acidul difenic, acidul 1-naftoic etc. (9) (10) (11).

REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

17. Există mult mai puține rapoarte privind studii despre teste de simulare decât despre teste pentru biodegradabilitate rapidă. Reproductibilitatea între duplicate (simultane) este bună (în limita a 10-15 %) pentru substanțe chimice testate degradate în procent de cel puțin 80 %, dar pentru substanțe chimice mai puțin degradate gradul de variație este mai mare. De asemenea, la unele substanțe chimice de limită s-au înregistrat rezultate foarte variate (de exemplu, 10 %, 90 %) în diferite ocazii în perioada celor 9 săptămâni în care s-a desfășurat testul.

18. S-au înregistrat diferențe mici între rezultatele obținute cu cele două tipuri de aparate, dar unele substanțe chimice s-au degradat mai mult și în mod constant în prezența apelor uzate de origine menajeră decât în cazul apelor uzate sintetice din testele OCDE.

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Aparatură

Sistem de testare

19. Sistemul de testare pentru o substanță chimică testată este format dintr-o unitate de testare și o unitate de control; dar atunci când se fac doar analize specifice (biodegradare primară), este nevoie doar de o unitate de testare. O unitate de control se poate utiliza pentru mai multe unități de testare care primesc fie aceeași substanță chimică testată, fie substanțe chimice testate diferite. În cazul cuplării unităților (apendicele 3), fiecare unitate de testare trebuie să aibă propria unitate de control. Sistemul de testare poate fi un model de instalație cu nămol activ, o unitate Husmann (apendicele 1, figura 1) sau un vas poros (apendicele 1, figura 2). În ambele cazuri sunt necesare vase de alimentare de mărime suficientă pentru influenți și efluenți, precum și pompe pentru dozarea influentului, fie amestecat cu soluția de substanță chimică testată, fie separat.

20. Fiecare instalație cu nămol activ este formată dintr-un vas de aerare cu o capacitate cunoscută de circa 3 litri de nămol activ și un separator (decantor secundar) cu o capacitate de circa 1,5 litri; volumele pot fi modificate, într-o oarecare măsură, prin ajustarea înălțimii separatorului. Sunt permise vase de dimensiuni diferite, cu condiția să fie utilizate la sarcini hidraulice comparabile. În cazul în care temperatura din camera de testare nu poate fi menținută în intervalul dorit, se recomandă utilizarea vaselor cu manta cu apă, cu temperatură controlată. Se utilizează o pompă de evacuare cu aer comprimat sau o pompă de dozare pentru reciclarea nămolului activ din separator spre vasul de aerare, fie în mod continuu, fie intermitent, la intervale regulate.

21. Sistemul cu vas poros constă într-un cilindru poros interior, cu fund conic, amplasat într-un vas ceva mai mare de aceeași formă, dar fabricat dintr-un material plastic impermeabil. Un material adecvat pentru vasul poros este polietilena poroasă, cu o dimensiune maximă a porilor de 90 μm și grosime de 2 mm. Separarea nămolului de mediul organic tratat se face prin trecerea diferențială prin peretele poros. Efluenții se colectează în spațiul inelar, de unde se revarsă în vasul de colectare. Nu se produce decantare, deci nu apare retur de nămol. Întregul sistem poate fi montat într-o baie de apă cu control termostatic. În fazele inițiale, vasele poroase se blochează și se pot revărsa.

▼M4

Într-o astfel de situație se înlocuiește căptușeala poroasă cu una curată, mai întâi prin sifonarea nămolului din vas într-o găleată curată și înlăturarea căptușelii blocate. După ștergerea temeinică a cilindrului exterior impermeabil se inserează o căptușeală curată și apoi se toarnă nămolul la loc în vas. De asemenea, se curăță bine și se înlătură orice rest de nămol care aderă la pereții căptușelii blocate. Vasele blocate se curăță mai întâi cu ajutorul unui jet fin de apă pentru a elimina resturile de nămol, apoi prin înmuiere în soluție diluată de hipoclorit de sodiu, apoi în apă, după care se clătesc bine cu apă.

22. Pentru aerarea nămolului în vasele de aerare din ambele sisteme este nevoie de tehnici adecvate, de exemplu cuburi din material sinterizat (pietre de difuzare) și aer comprimat. Aerul trebuie să fie curățat, dacă este necesar, prin trecerea printr-un filtru adecvat și apoi trebuie să fie spălat. Prin sistem trebuie să treacă suficient aer pentru a menține condiții aerobe și pentru a păstra precipitatele floconoase de nămol în suspensie pe toată durata testului.

Aparat de filtrare sau centrifugă

23. Dispozitiv de filtrare a probelor cu filtre cu membrană de porozitate corespunzătoare (diametrul deschiderii nominale de 0,45 μm), care adsorb substanțele chimice organice și eliberează carbon organic la un nivel minim. Atunci când se utilizează filtre care eliberează carbon organic, ele trebuie să fie spălate cu grijă cu apă caldă, pentru a înlătura carbonul organic lixiviabil. Ca alternativă, se poate utiliza și o centrifugă care poate produce o accelerație de 40 000 m/s^2.

Echipamente pentru analiză

24. Aparat necesar pentru a determina:

— COD (carbon organic dizolvat) și COT (carbon organic total) sau CCO (consum chimic de oxigen);

— substanțele chimice specifice, dacă este necesar;

— materiile solide în suspensie, pH, concentrația de oxigen în apă;

— temperatura, aciditatea și alcalinitatea;

— conținutul de amoniu, nitriți și nitrați, în cazul în care testul se face în condiții nitrificatoare.

Apă

25. Apă de la robinet, cu conținut de COD mai mic de 3 mg/l. Trebuie să se determine alcalinitatea, atunci când nu este deja cunoscută.

26. Apă deionizată, cu conținut de COD mai mic de 2 mg/l.

Mediu organic

27. Ca mediu organic se poate utiliza apă uzată sintetică, apă uzată menajeră sau un amestec din cele două. S-a demonstrat (11) (14) că numai prin utilizarea apei uzate menajere se ajunge deseori la un procent crescut de eliminare a COD și chiar se permit eliminarea și biodegradarea unor substanțe chimice care nu sunt biodegradate atunci când se utilizează apa uzată sintetică din testele OCDE. De asemenea, adăugarea constantă sau intermitentă de apă uzată menajeră conduce adesea la stabilizarea nămolului activ, inclusiv la capacitatea esențială de decantare satisfăcătoare. Astfel, se recomandă utilizarea apei uzate menajere. Trebuie să se măsoare concentrația de COD sau CCO în fiecare lot nou de mediu organic. Trebuie să se cunoască aciditatea sau alcalinitatea mediului organic. În cazul în care mediul organic are o aciditate sau alcalinitate scăzută, ar putea fi necesar să se adauge o soluție tampon corespunzătoare (bicarbonat de sodiu sau fosfat diacid de potasiu), pentru a menține un pH de circa 7,5 ± 0,5 în vasul de aerare în timpul testului. Cantitatea de soluție tampon care se adaugă, precum și momentul adăugării, sunt decise pentru fiecare caz în parte. Atunci când se utilizează amestecuri, fie în mod continuu, fie intermitent, COD (sau CCO) al amestecului trebuie să fie menținut la o valoare aproximativ constantă, de exemplu prin diluare cu apă.

▼M4

Apă uzată sintetică

28. În fiecare litru de apă de la robinet se dizolvă: peptonă, 160 mg; extract de carne, 110 mg; uree, 30 mg; fosfat acid de di-potasiu anhidru (K_2HPO4), 28 mg; clorură de sodiu (NaCl), 7 mg; clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfat de magneziu heptahidrat ($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Această apă uzată sintetică din testele OCDE este un exemplu și indică o concentrație medie a COD în influent de circa 100 mg/l. Ca metodă alternativă, se pot utiliza alte amestecuri, cu aproximativ aceeași concentrație de COD, care sunt apropiate de apele uzate reale. În cazul în care este nevoie de un influent mai puțin concentrat, apa uzată sintetică se diluează, de exemplu în proporție de 1:1, cu apă de la robinet, pentru a obține o concentrație de circa 50 mg/l. Un astfel de influent mai slab va oferi condiții mai bune de creștere a organismelor nitrificatoare și această modificare trebuie să fie utilizată în cazul în care se analizează simularea instalațiilor de tratare a apelor uzate prin nitrificare. Apa uzată sintetică poate fi obținută din apă distilată într-o formă concentrată și poate fi depozitată la circa 1 °C până la o săptămână. Atunci când este nevoie să fie utilizată, se diluează cu apă de la robinet. (Acest mediu nu este satisfăcător, de exemplu concentrația de azot este foarte mare, conținutul de carbon este relativ scăzut, dar nu s-a propus nicio altă metodă mai bună, cu excepția adăugării unei cantități mai mari de fosfat ca soluție tampon și a creșterii procentului de peptonă).

Apă uzată menajeră

29. Se utilizează apă uzată proaspătă decantată, colectată zilnic dintr-o instalație de tratare care primește în special apă uzată menajeră. Apa trebuie să fie colectată, înainte de sedimentarea primară, din canalul deversor al rezervorului de sedimentare primară sau din alimentarea instalației de nămol activ și trebuie să fie, în mare măsură, lipsită de particule grosiere. Apa uzată poate fi utilizată după ce a fost depozitată timp de mai multe zile (dar, în general, nu trebuie să se depășească șapte zile) la circa 4 °C, dacă s-a dovedit că COD (sau CCO) nu a scăzut în mod semnificativ (adică cu mai puțin de 20 %) în timpul perioadei de depozitare. Pentru a limita perturbațiile aduse sistemului, COD (sau CCO) din fiecare lot nou trebuie să fie ajustat înainte de utilizare la o valoare constantă adecvată, de exemplu prin diluarea cu apă de la robinet.

Nămol activ

30. Nămolul activ pentru inoculare se colectează din bazinul de aerare al unei instalații de epurare a apelor uzate care funcționează corespunzător sau dintr-o unitate de laborator cu nămol activ, care tratează în principal ape uzate menajere.

Soluții stoc de substanță chimică testată

31. Pentru substanțe chimice cu solubilitate adecvată, se prepară soluții stoc de concentrații corespunzătoare (de exemplu, de la 1 până la 5 g/l) în apă deionizată sau în partea minerală a apei uzate sintetice (pentru substanțe chimice insolubile și volatile, a se vedea apendicele 5). Se determină COD și carbonul organic total (COT) ale soluției stoc și se repetă măsurătorile pentru fiecare lot nou. În cazul în care diferența dintre COD și COT este mai mare de 20 %, se verifică solubilitatea în apă a substanței chimice testate. Se compară COD sau concentrația substanței chimice testate măsurate prin analiza specifică a soluției stoc cu valoarea nominală, pentru a verifica dacă recuperarea este suficient de bună (în mod normal se poate aștepta o valoare > 90 %). Se verifică, în special pentru dispersii, dacă COD poate fi utilizat sau nu ca parametru analitic sau dacă pentru substanța chimică testată se poate utiliza doar o tehnică de analiză specifică. Pentru dispersii este necesară centrifugarea probelor. Pentru fiecare lot nou se măsoară COD, CCO sau substanța chimică testată, printr-o analiză specifică.

▼M4

32. Se determină pH-ul soluției stoc. Valorile extreme indică faptul că adăugarea substanței chimice poate avea o influență asupra pH-ului nămolului activ în sistemul de testare. În acest caz, soluția stoc se neutralizează, pentru a obține un pH de 7 ± 0,5, cu mici cantități de acid sau bază anorganică, dar se evită precipitarea substanței chimice testate.

PROCEDURĂ

33. Procedura este descrisă pentru instalațiile cu nămol activ; ea trebuie să fie ușor adaptată pentru sistemul cu vas poros.

Prepararea inoculului

34. Sistemul de testare se inoculează la începutul testului, fie cu nămol activ, fie cu un inocul cu concentrație scăzută de microorganisme. Până la utilizare, inoculul se păstrează aerat la temperatura camerei și se utilizează în termen de 24 de ore. În primul caz, se prelevează o probă de nămol activ din bazinul de aerare al unei instalații de epurare biologică a apelor uzate care funcționează eficient sau al unei instalații de tratare de laborator, care primește în principal apă uzată menajeră. În cazul în care se simulează condiții de nitrificare, nămolul se ia dintr-o instalație de epurare a apelor uzate prin nitrificare. Se determină concentrația de materii solide în suspensie și, dacă este necesar, se concentrează nămolul prin decantare, astfel încât volumul adăugat la sistemul de testare să fie minim. Se asigură o concentrație inițială de substanță uscată de circa 2,5 g/l.

35. În al doilea caz, se utilizează ca inocul de la 2 ml/l până la 10 ml/l dintr-un efluent de la o instalație de epurare biologică a apelor uzate menajere. Pentru a obține cât mai multe specii diferite de bacterii, poate fi utilă adăugarea de inocul din diverse alte surse, de exemplu din ape de suprafață. În acest caz, nămolul activ se va dezvolta și va crește în sistemul de testare.

Dozarea mediului organic

36. Se asigură curățarea temeinică a recipientelor pentru influent și efluent și a tuburilor de la vasele pentru influent și către vasele pentru efluent, pentru a înlătura creșterea microbiană inițială și pe parcursul testului. Sistemele de testare se asamblează într-o încăpere cu temperatură controlată (în mod normal, între 20 și 25 °C) sau se utilizează unități de testare cu manta cu apă. Se prepară un volum suficient din mediul organic necesar (punctele 27-29). Inițial, vasul de aerare și separatorul se umplu cu mediul organic și se adaugă inoculul (punctele 34, 35). Se începe aerarea astfel încât nămolul să fie menținut în suspensie și într-o stare aerobă și se începe dozarea influentului și reciclarea nămolului decantat. Se dozează mediul organic din vasele de alimentare în vasele de aerare (punctele 20, 21) ale unităților de testare și de control și se colectează efluenții respectivi în vase de alimentare similare. Pentru a obține un timp de retenție hidraulică normal de 6 h, mediul organic este pompat cu un debit de 0,5 l/h. Pentru confirmarea acestui debit, se măsoară cantitatea zilnică de mediu organic dozat, notând reducerea volumelor mediului în vasele de alimentare. Alte moduri de dozare sunt necesare pentru determinarea efectelor degajării intermitente și a încărcării substanțelor chimice în doze „șoc”.

37. Atunci când mediul organic este preparat pentru a fi utilizat pe o perioadă mai mare de o zi, este necesar să fie răcit la circa 4 °C sau să se folosească alte metode de conservare pentru prevenirea creșterii microbiene și a biodegradării în exteriorul unităților de testare (punctul 29). Atunci când se utilizează apă uzată sintetică, se poate prepara și depozita la circa 4 °C o soluție stoc concentrată (de exemplu, de 10 ori concentrația normală, punctul 28). Înainte de utilizare, această soluție stoc poate fi amestecată bine cu un volum corespunzător de apă de la robinet; sau poate fi pompată direct, în timp ce se pompează separat volumul corespunzător de apă de la robinet.

▼M4

Dozarea substanței chimice testate

38. Se adaugă un volum corespunzător de soluție stoc din substanța chimică testată (punctul 31) la vasul de alimentare pentru influent sau se dozează direct în vasul de aerare, cu o pompă separată. Concentrația de testare medie normală în influent trebuie să fie între 10 mg/l și 20 mg/l COD, cu o concentrație maximă de cel mult 50 mg/l. În cazul în care solubilitatea în apă a substanței chimice testate este scăzută sau dacă pot apărea efecte toxice, se reduce concentrația la 5 mg/l COD sau chiar mai puțin, dar numai atunci când este disponibilă și se utilizează o metodă analitică specifică corespunzătoare (se pot adăuga substanțe chimice testate dispersate și greu solubile în apă, cu ajutorul unor tehnici de dozare speciale, a se vedea apendicele 5).

39. Se începe adăugarea substanței chimice testate după o perioadă în care sistemul s-a stabilizat și se elimină eficient COD din mediul organic (circa 80 %). Este important să se verifice dacă toate unitățile funcționează la fel de eficient înainte de adăugarea substanței chimice testate; în caz contrar, de obicei este util să se amestece nămolurile individuale și să se redistribuie volume egale la unitățile individuale. Atunci când se folosește un inocul de nămol activ de (circa) 2,5 g/l (greutate uscată), substanța chimică testată se poate adăuga de la începutul testului, deoarece adăugarea directă, de la început, a unor cantități din ce în ce mai mari are avantajul că nămolul activ se poate adapta mai bine la substanța chimică testată. Indiferent de metoda de adăugare a substanței chimice testate, se recomandă măsurarea la intervale regulate a debitului relevant și/sau a volumelor din vasul (vasele) de alimentare.

Manipularea nămolului activ

40. În mod normal, concentrația de materii solide în nămolul activ se stabilizează între anumite limite în timpul testului, independent de inoculul folosit, între 1 și 3 g/l (greutate uscată), în funcție de calitatea și concentrația mediului organic, de condițiile de funcționare, de natura microorganismelor prezente și de influența substanței chimice testate.

41. Fie se determină materiile solide în suspensie în vasele de aerare cel puțin o dată pe săptămână și se elimină nămolul în exces pentru a se menține concentrația la o valoare între 1 g/l și 3 g/l (greutate uscată), fie se controlează vârsta medie a nămolului la o valoare constantă, de obicei între 6 și 10 zile. De exemplu, dacă se alege un timp de retenție a nămolului de 8 zile, se scoate zilnic 1/8 din volumul nămolului activ din vasul de aerare și se elimină. Se face acest lucru zilnic sau, de preferință, printr-o pompă automată cu funcționare intermitentă. Prin menținerea unei concentrații de materii solide în suspensie la o valoare constantă sau între niște limite înguste nu se menține un timp constant de retenție a nămolului (TRN), care este variabila de funcționare ce determină valoarea concentrației substanței chimice testate în efluent.

42. Pe toată durata testului se înlătură, cel puțin o dată pe zi, orice nămol care aderă la pereții vasului de aerare și ai separatorului, astfel încât să se refacă suspensia. Se verifică și se curăță regulat toate tuburile și țevile, pentru a preveni dezvoltarea biopeliculei. Nămolul decantat din separator spre vasul de aerare se reciclează, de preferință prin pompare intermitentă. În sistemul cu vas poros nu are loc reciclare, dar trebuie să se asigure inserarea de vase interioare curate înainte ca volumul din vase să crească semnificativ (punctul 21).

43. În unitățile Husmann, decantarea poate fi necorespunzătoare și pot apărea pierderi de nămol. Pentru a remedia acest neajuns, se poate recurge la una sau mai multe din acțiunile enumerate mai jos, în paralel în unitățile de testare și de control:

— se poate adăuga nămol proaspăt sau floculant (de exemplu, 2 ml/vas cu soluție de $FeCl_3$ în concentrație de 50 g/l) la intervale regulate, de exemplu zilnic, dar trebuie să se verifice că nu apare o reacție sau o precipitare a substanței chimice testate la contactul cu $FeCl_3$;

▼M4

— pompa de evacuare cu aer comprimat poate fi înlocuită cu o pompă peristaltică, permițând astfel un debit de recirculare a nămolului aproape egal cu debitul influentului utilizat și permițând dezvoltarea unei zone aerobe în nămolul decantat (geometria pompei de evacuare cu aer comprimat limitează debitul minim al nămolului returnat la circa de 12 ori cel al influentului);

— nămolul poate fi pompat intermitent din separator spre vasul de aerare (de exemplu, timp de 5 minute la fiecare 2,5 h, pentru a recicla între 1 l/h și 1,5 l/h);

— un agent antispumare netoxic, la concentrație minimă, se poate folosi pentru a preveni pierderea prin spumare (de exemplu, ulei siliconic);

— aerul poate fi trecut prin nămolul din separator în impulsuri scurte, de șoc (de exemplu, câte 10 secunde la fiecare oră);

— mediul organic poate fi dozat la intervale în vasul de aerare (de exemplu, 3 până la 10 minute la fiecare oră).

Prelevare de probe și analiză

44. La intervale regulate se măsoară concentrația de oxigen dizolvat, temperatura și valoarea pH-ului nămolului activ din vasele de aerare. Se asigură că există întotdeauna suficient oxigen (> 2 mg/l) și că temperatura este menținută în intervalul necesar (în mod normal, între 20 și 25 °C). pH-ul se menține la 7,5 ± 0,5 prin dozarea unor cantități mici de bază sau acid anorganic în vasul de aerare sau prin creșterea capacității de tamponare a mediului organic (a se vedea punctul 27). Atunci când apare nitrificarea se produce acid, oxidarea unui miligram de azot producând echivalentul a 7 mg CO_3^-. Frecvența de măsurare depinde de parametrul de măsurat și de stabilitatea sistemului și poate varia între măsurători zilnice și săptămânale.

45. Se măsoară COD sau CCO în influenții către vasele de control și de testare. Concentrația de substanță chimică testată în influentul de testare se măsoară prin analiză specifică sau se estimează din concentrația în soluția stoc (punctul 31), volumul utilizat și cantitatea de apă uzată dozată în unitatea de testare. Se recomandă să se calculeze concentrația substanței chimice testate, pentru a reduce variabilitatea datelor privind concentrația.

46. Se prelevează probe corespunzătoare din efluentul colectat (de exemplu, compozit pe 24 h) și se filtrează printr-o membrană cu pori de 0,45 μm sau se centrifughează la circa 40 000 m/s^2 timp de aproximativ 15 minute. Centrifugarea trebuie să fie folosită atunci când filtrarea este dificilă. Se determină COD sau CCO cel puțin de două ori pentru a măsura biodegradarea finală și, dacă este necesar, biodegradarea primară printr-o analiză specifică pentru substanța chimică testată.

47. Folosirea CCO poate duce la probleme de analiză la concentrații scăzute, prin urmare este recomandată doar atunci când se utilizează o concentrație de testare suficient de ridicată (circa 30 mg/l). De asemenea, pentru substanțe chimice cu putere mare de adsorbție, se recomandă măsurarea cantității de substanță chimică adsorbită din nămol cu ajutorul unei tehnici de analiză specifică pentru substanța chimică testată.

48. Frecvența de prelevare a probelor depinde de durata estimată a testului. Frecvența recomandată este de trei ori pe săptămână. După ce unitățile funcționează eficient, se lasă o perioadă de adaptare de una până la șase săptămâni de la introducerea substanței chimice testate, pentru a ajunge la o stare stabilă. Este preferabil să se obțină cel puțin 15 valori valabile în faza de platou (punctul 59), care în mod normal durează trei săptămâni, pentru evaluarea rezultatelor testului. Testul poate fi încheiat atunci când s-a atins un grad suficient de eliminare (de exemplu, > 90 %) și când sunt disponibile aceste 15 valori, care reprezintă analizele efectuate în fiecare zi a săptămânii, timp de 3 săptămâni. În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 12 săptămâni de la introducerea substanței chimice testate.

▼M4

49. Dacă nămolul nitrifică și se studiază efectele substanței chimice testate asupra nitrificării, se analizează probe din efluentul din unitățile de testare și control cel puțin o dată pe săptămână, pentru depistarea amoniului și/sau nitritului plus nitratului.

50. Toate analizele trebuie să fie efectuate cât mai devreme posibil, în special determinările azotului. În cazul în care trebuie să se amâne analizele, probele se depozitează la 4 °C, la întuneric, în sticle închise etanș. Atunci când trebuie să se depoziteze probele mai mult de 48 de ore, se conservă prin congelare, acidifiere (de exemplu, 10 mg/l dintr-o soluție de acid sulfuric în concentrație de 400 g/l) sau prin adăugarea unei substanțe toxice adecvate [de exemplu, 20 ml/l dintr-o soluție de clorură de mercur (II) în concentrație de 10 g/l]. Se asigură că tehnica de conservare nu influențează rezultatul analizei.

Cuplarea unităților de testare

51. Atunci când se folosește cuplarea (apendicele 3), se schimbă zilnic aceeași cantitate de nămol activ (între 150 ml și 1 500 ml pentru vase de aerare care conțin 3 litri de soluție apoasă) între vasele de aerare ale unității de testare și cele ale unității de control. În cazul în care substanța chimică testată adsoarbe puternic pe nămol, se schimbă doar supernatantul separatoarelor. În ambele cazuri se folosește un factor de corecție pentru calculul rezultatelor testului (punctul 55).

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

52. Se calculează procentul de eliminare a COD sau CCO din substanța chimică testată, pentru fiecare evaluare într-un interval de timp, cu ecuația:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

unde:

D_t = % eliminare COD sau CCO la momentul t

C_s = COD sau CCO în influent, datorită substanței chimice testate, de preferință estimată din soluția stoc (mg/l)

E = valoarea COD sau CCO măsurată în efluentul de testare la momentul t (mg/l)

E_o = valoarea COD sau CCO măsurată în efluentul de control la momentul t (mg/l)

53. Gradul de eliminare a COD sau CCO din mediul organic în unitatea de testare este o informație utilă pentru evaluarea activității de biodegradare a nămolului activ în timpul testului. Se calculează procentul de eliminare cu ecuația:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

unde:

D_B = % eliminare COD sau CCO în mediul organic în unitatea de control la momentul t

C_M = COD sau CCO în mediul organic în influentul de control (mg/l)

▼M4

Opțional, se calculează procentul de eliminare a COD sau CCO datorat mediului organic plus substanței chimice testate în unitatea de testare cu ecuația:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

unde:

D_T = % eliminare COD sau CCO în totalul influentului de testare

C_T = COD sau CCO în totalul influentului de testare sau calculat din soluțiile stoc (mg/l)

54. Se calculează eliminarea substanței chimice testate dacă este măsurată cu o metodă analitică specifică la fiecare evaluare temporală, cu ecuația:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

unde:

D_{ST} = % eliminare primară a substanței chimice testate la momentul t

S_i = concentrația de substanță chimică, măsurată sau estimată în influentul de testare (mg/l)

S_e = concentrația de substanță chimică testată, măsurată sau estimată în efluentul de testare la momentul t (mg/l)

55. În cazul în care s-a folosit modul de cuplare, diluția substanței chimice testate în vasul de aerare la schimbul de nămol se compensează cu ajutorul unui factor de corecție (a se vedea apendicele 3). Dacă s-au utilizat un timp de retenție hidraulică mediu de 6 ore și un schimb de jumătate din volumul de nămol activ în vasul de aerare, valorile de eliminare zilnică determinate (D_t, punctul 52) trebuie să fie corectate pentru a obține gradul de eliminare real, D_{tc} al substanței chimice testate, cu ecuația:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Exprimarea rezultatelor testului

56. Se face graficul eliminării procentuale D_t (sau D_{tc}) și D_{st}, dacă este disponibil, în funcție de timp (a se vedea apendicele 2). Din forma curbei de eliminare a substanței chimice testate (în sine sau ca COD) se pot trage unele concluzii despre procesul de eliminare.

Adsorbție

57. Dacă de la începutul testului se observă un nivel ridicat de eliminare a COD din substanța chimică testată, probabil că substanța chimică testată este eliminată prin adsorbție pe materiile solide din nămolul activ. Acest lucru se poate dovedi prin determinarea substanței chimice testate adsorbite, prin analize specifice. Nu este uzual ca nivelul de eliminare a COD din substanțele chimice adsorbabile să rămână ridicat pe toată durata testului; în mod normal, eliminarea este mai pronunțată la început, iar apoi scade treptat până la o valoare de echilibru. Totuși, dacă substanța chimică testată adsorbabilă a putut duce la aclimatizarea populației microbiene într-un fel sau altul, gradul de eliminare a COD din substanța chimică testată ar urma să crească ulterior, ajungând la o valoare de platou ridicată.

▼M4

Fază de latență

58. La fel ca în cazul testelor statice de screening, pentru multe substanțe chimice testate este nevoie de o fază de latență înainte de apariția biodegradării totale. În faza de latență, aclimatizarea sau adaptarea bacteriilor de degradare are loc aproape fără nicio eliminare din substanța chimică testată; apoi apare creșterea inițială a acestor bacterii. Această fază se încheie, iar faza de degradare se consideră că începe atunci când este înlăturată circa 10 % din cantitatea totală de substanță chimică testată (după ce se lasă timp pentru adsorbție, dacă apare). Faza de latență este adesea foarte variabilă și slab reproductibilă.

Fază de platou

59. Faza de platou a unei curbe de eliminare dintr-un test continuu este definită ca fiind faza în care are loc degradarea maximă. Faza de platou trebuie să fie de cel puțin 3 săptămâni și să conțină circa 15 valori măsurate valabile.

Grad mediu de eliminare a substanței chimice testate

60. Se calculează valoarea medie din valorile de eliminare (D_t) ale substanței chimice testate în faza de platou. Rotunjit la cel mai apropiat număr întreg (1 %), reprezintă gradul de eliminare a substanței chimice testate. De asemenea, se recomandă calcularea intervalului de încredere de 95 % pentru valoarea medie.

Eliminare din mediul organic

61. Se face graficul eliminării de COD sau CCO din mediul organic în unitatea de control (D_B) funcție de timp. Se indică gradul minim de eliminare în același mod ca și pentru substanța chimică testată (punctul 60).

Indicarea biodegradării

62. Dacă substanța chimică testată nu adsoarbe în mod semnificativ pe nămolul activ și curba de eliminare are forma tipică a unei curbe de biodegradare cu faze de latență, degradare și platou (punctele 58, 59), eliminarea măsurată poate fi atribuită fără ezitare biodegradării. Dacă are loc o înlăturare inițială ridicată, testul de simulare nu poate face diferența între procesele de eliminare biologică și abiotică. În asemenea cazuri, precum și în alte cazuri în care există dubii privind biodegradarea (de exemplu, dacă are loc procesul de stripare), se analizează substanțele chimice testate adsorbite sau se efectuează teste de biodegradare statică suplimentare, pe baza parametrilor care indică în mod clar procese biologice. Astfel de teste sunt metodele de absorbție a oxigenului [capitolul C.4 D, E și F din prezenta anexă (6)] sau un test cu măsurarea producției de dioxid de carbon [capitolul C.4 C din prezenta anexă (6)] sau metoda ISO Headspace (18), folosind un inocul preexpus, din testul de simulare. Dacă s-au măsurat atât eliminarea COD, cât și eliminarea substanței chimice specifice, diferențele semnificative (prima fiind mai scăzută decât a doua) dintre procentele eliminate indică prezența de produse organice intermediare în efluenți, care pot fi mai dificil de degradat decât substanța chimică inițială.

Validarea rezultatelor testelor

63. Informații despre comportamentul normal de biodegradare a inoculului se obțin dacă se determină gradul de eliminare din mediul organic (punctul 53) în unitatea de control. Testul este considerat valabil dacă gradul de eliminare a COD sau CCO în unitatea (unitățile) de control este > 80 % după două săptămâni și nu s-au înregistrat observații neobișnuite.

▼M4

64. Dacă s-a utilizat o substanță chimică (de referință) ușor biodegradabilă, gradul de biodegradare (D_t, punctul 52) trebuie să fie > 90 %.

65. Atunci când testul este efectuat în condiții de nitrificare, concentrația medie în efluenți trebuie să fie < 1 mg/l de azot amoniacal și < 2 mg/l de azot nitric.

66. Dacă aceste criterii (punctele 63-65) nu sunt îndeplinite, se repetă testul folosind un inocul dintr-o sursă diferită, se testează o substanță chimică de referință și se revizuiesc toate procedurile experimentale.

Raport de testare

67. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică testată:

— date de identificare;

— natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice.

Condițiile de testare:

— tipul sistemului de testare; orice modificări pentru testarea substanțelor chimice insolubile și volatile;

— tipul mediului organic;

— proporția și natura apelor reziduale industriale prezente în apele uzate, dacă se cunosc;

— inoculul, natura și locul (locurile) de prelevare a probelor, concentrația și orice tratare preliminară;

— soluția stoc de substanță chimică testată: conținutul de COD și COT; modul de preparare, dacă este în suspensie; concentrația de testare utilizată; motivele, dacă COD nu se încadrează în limitele 10-20 mg/l; metoda de adăugare; data primei adăugări; orice schimbări;

— vârsta medie a nămolului și timpul mediu de retenție hidraulică; metoda de înlăturare a surplusului de nămol; metode de prevenire a aglomerării, pierderii de nămol etc.;

— tehnici de analiză utilizate;

— temperatura de testare;

— calitățile aglomeratelor de nămol, indexul de volum al nămolului (IVN), materiile solide în suspensie în soluția apoasă mixtă (MSSSAM);

— orice deviație de la procedurile standard și orice circumstanțe care ar fi putut afecta rezultatele.

Rezultatele testului:

— toate datele măsurate (COD, CCO, analize specifice, pH, temperatură, concentrație de oxigen, materii solide în suspensie, substanțe azotoase, dacă sunt relevante);

— toate valorile calculate ale D_t (sau D_{tc}), D_B, D_{St} obținute în formă tabelară și curbele de eliminare;

— informații privind fazele de latență și platou, durata de testare, gradul de eliminare a substanței chimice testate și a mediului organic în unitatea de control, împreună cu informații statistice și specificații privind biodegradabilitatea și valabilitatea testului;

— discutarea rezultatelor.

▼**M4**

BIBLIOGRAFIE:

(1) Swisher R.D. (1987), „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc., New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962), Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents, Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter H.A. and King E.F. (1978a), WRc porous-pot method for assessing biodegradability, Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H.A. and King E.F. (1978b), The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants, Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W. (19) US EPA.

(6) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» ”.

(7) Capitolul C.12 din prezenta anexă, „Biodegradare – Testul SCAS modificat”.

(8) Capitolul C.19 din prezenta anexă, „Estimarea coeficientului de adsorbție (K_{CO}) pe sol și nămol de epurare cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC)”.

(9) Gerike P. și Fischer W.K. (1979), A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P. și Fischer W.K. (1981), as (9), II Additional results and conclusions, Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter H.A. and Bealing D. (1989), Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp. 113-138. În: Laboratory tests for simulation of water treatment processes, CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revizuit 2004), Calitatea apei. Determinarea eliminării și a biodegradabilității compușilor organici în mediu apos. Test de simulare cu nămol activ.

(13) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984), Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K. and Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test, Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G. și Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982), Assessment of biodegradability, Methods for the examination of waters and associated materials, pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998), Calitatea apei. Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetic (încercare cu CO_2 în spațiul superior).

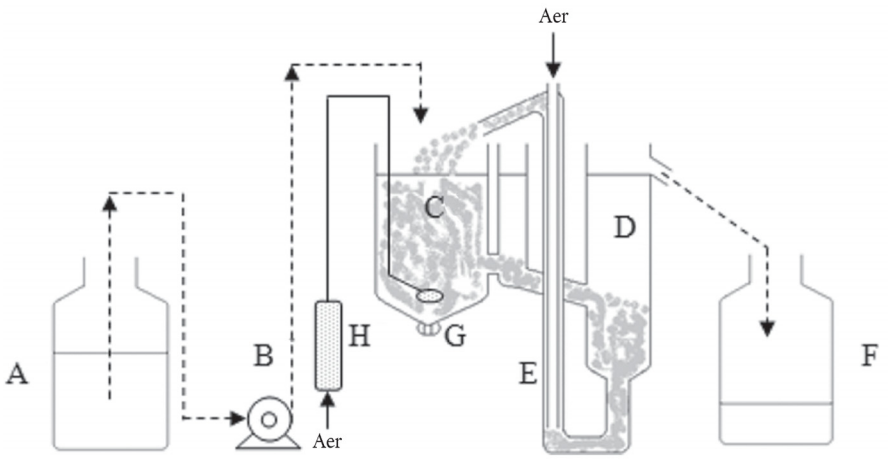
▼M4

Apendicele 1

Figura 1

Echipament utilizat pentru evaluarea biodegradabilității

Unitate Husmann



A. Vas de alimentare

B. Pompă de dozare

C. Vas de aerare (capacitate 3 l)

D. Vas de decantare

E. Pompă de evacuare cu aer comprimat

F. Vas de colectare

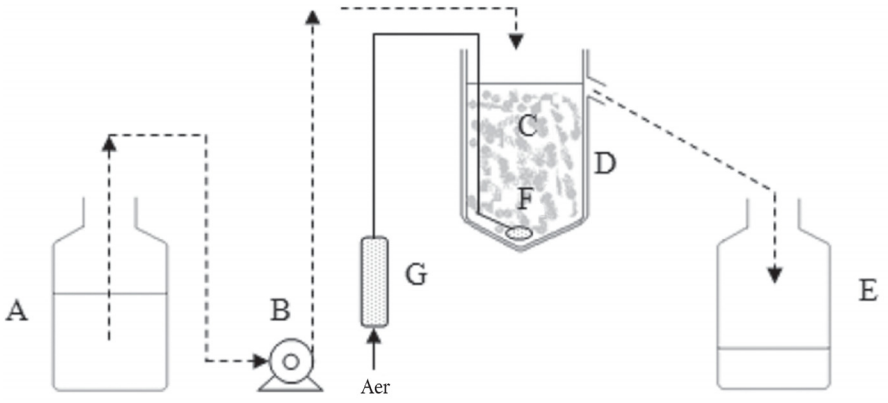
G. Aerator

H. Contor debit de aer

Figura 2

Echipament utilizat pentru evaluarea biodegradabilității

Vas poros



A. Vas de alimentare

B. Pompă dozatoare

C. Vas poros de aerare

D. Vas exterior impermeabil

E. Vas de colectare

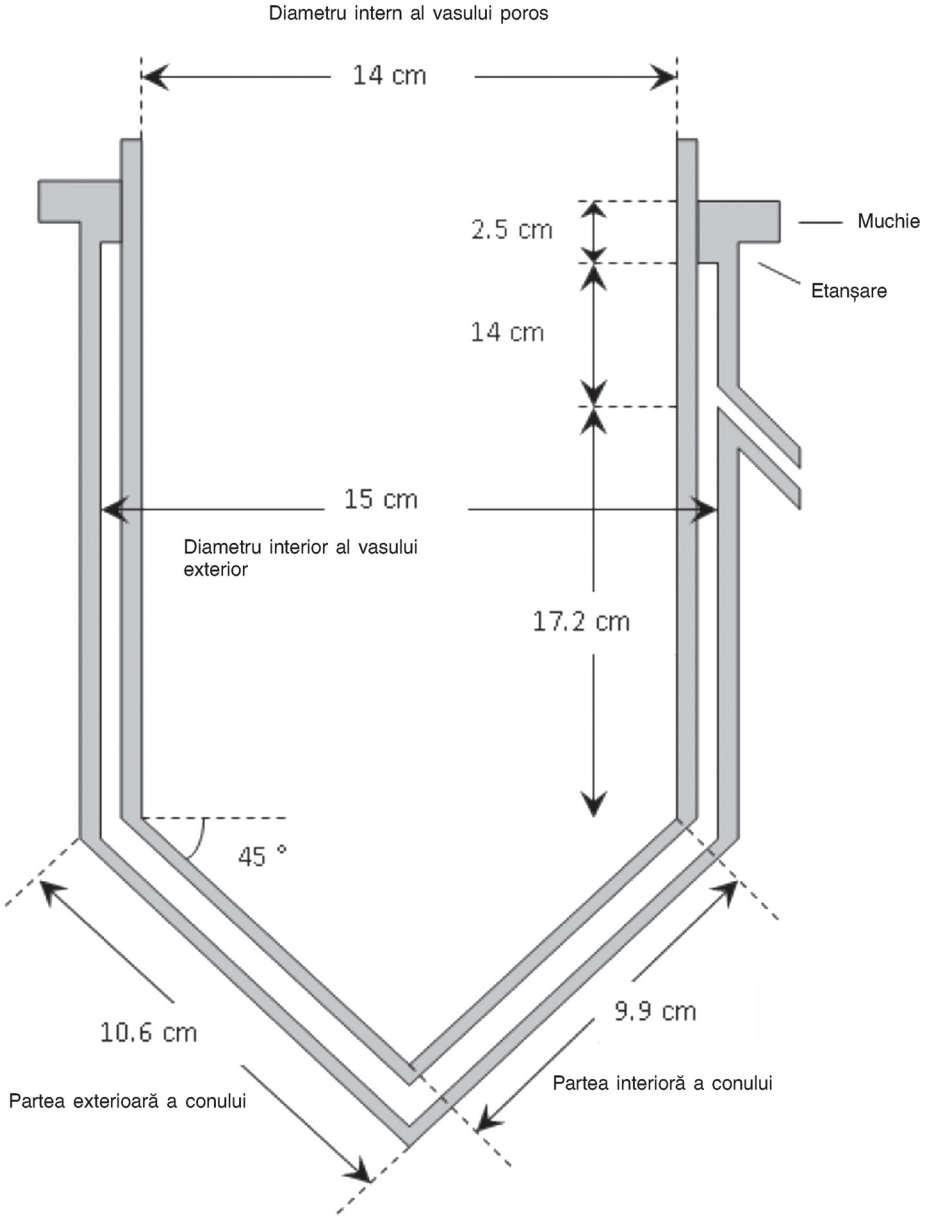
F. Difuzor

G. Contor debit de aer

▼M4

Figura 3

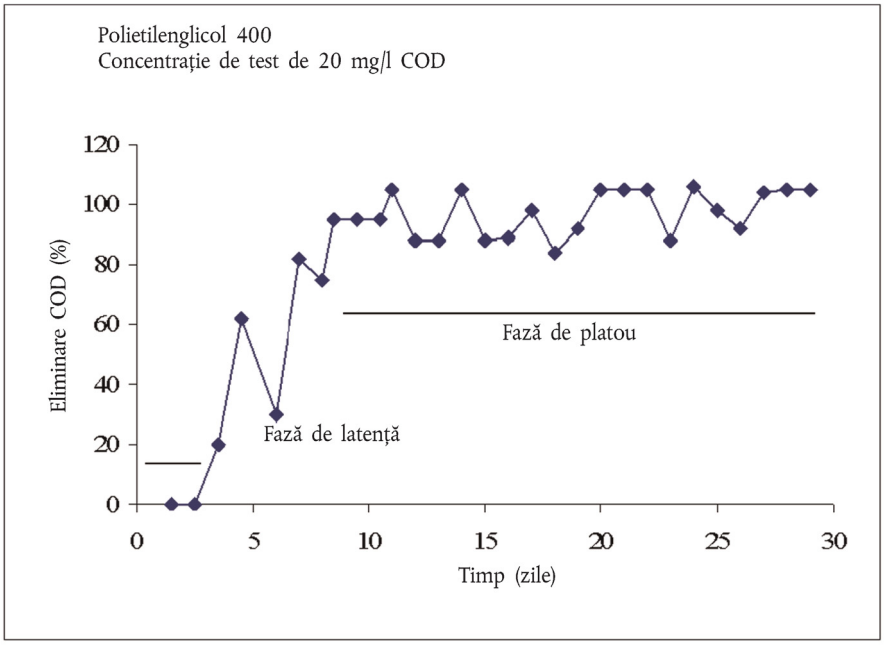
Detalii ale vasului poros de aerare de 3 litri



▼**M4**

Apendicele 2

Exemplu de curbă de eliminare



▼**M4**

Apendicele 3

[INFORMATIV]

CUPLAREA UNITĂȚILOR DE TESTARE

Pentru a încerca egalizarea populațiilor microbiene în nămolurile din unitatea de testare, care primește ape uzate plus o substanță chimică testată, și din unitatea de control, care primește doar ape uzate, s-a introdus schimbul reciproc de nămol (1). Procedura s-a numit cuplare, iar metoda este cunoscută sub numele de regim cu instalații cuplate. Inițial, cuplarea s-a realizat cu ajutorul unităților Husmann cu nămol activ, dar ea s-a făcut și cu unități de tip vas poros (2) (3). Nu s-au constatat diferențe semnificative între rezultatele obținute cu unități necuplate și cu unități cuplate, fie de tip Husmann, fie de tip vas poros, deci nu este avantajos să se dedice mai mult timp și energie pentru cuplarea unităților.

Schimburile de nămol pot apărea ca o înlăturare destul de considerabilă, întrucât unele din substanțele chimice testate sunt transferate, iar concentrațiile de substanță chimică testată din efluenții de testare și de control se apropie mai mult de egalitate. Astfel, trebuie să se folosească factori de corecție, care depind de fracțiunea schimbată și de timpul mediu de retenție hidraulică. S-au publicat mai multe detalii privind acest calcul (1).

Se calculează gradul de eliminare a COD sau CCO corectat, cu ajutorul formulei generale:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

unde:

D_{tc} = % corectat de eliminare a COD sau CCO

D_t = % determinat de eliminare a COD sau CCO

a = fracțiunea de schimb a volumului unităților de nămol activ

r = timpul mediu de retenție hidraulică (h)

Dacă, de exemplu, jumătate din volumul din vasul de aerare este schimbat (a = 0,5), iar timpul mediu de retenție hidraulică este de 6 h, formula de corecție este:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFIE:

(1) Fischer W., Gerike P., Holtmann W. (1975), Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter H.A., Bealing D.J. (1989), Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. În: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978), Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Apendicele 4

EVALUAREA INHIBIȚIEI NĂMOLULUI ACTIV

Proces în funcție de substanțele chimice testate

1. O substanță chimică (sau o apă uzată) poate să nu fie degradată sau înlăturată în testul de simulare și poate avea chiar un efect inhibitor asupra microorganismelor din nămol. Alte substanțe chimice sunt biodegradate la concentrații scăzute, dar sunt inhibitoare la concentrație mai mare (hormeză). Este posibil ca efectele inhibitoare să fi fost relevate într-un stadiu mai incipient sau ele pot fi determinate prin aplicarea unui test de toxicitate, cu ajutorul unui inocul similar sau identic cu cel folosit în testul de simulare (1). Astfel de metode sunt inhibarea absorbției de oxigen [capitolul C.11 din prezenta anexă (2) și ISO 8192 (3)] sau inhibarea creșterii organismelor din nămol [ISO 15522 (4)].

2. În testul de simulare, orice inhibiție se va manifesta prin faptul că diferența de carbon organic dizolvat (COD) sau consum chimic de oxigen CCO între efluentul din vasul de testare și cel din vasul de control este mai mare decât COD adăugat ca substanță chimică testată. Exprimat în alt mod, înlăturarea procentuală a COD (și consumul biochimic de oxigen CBO, consumul chimic de oxigen CCO și/sau NH^{+}_{4}) din mediul organic tratat va scădea în prezența substanței chimice testate. Dacă se întâmplă acest lucru, testul trebuie să fie repetat, reducând concentrația substanței chimice testate până ce se atinge un nivel la care nu apare inhibiția și eventual se reduce concentrația în continuare până ce substanța chimică testată este biodegradată. Totuși, dacă substanța chimică testată (sau apa uzată) are efecte adverse asupra procesului la toate concentrațiile testate, sunt indicii că este dificil, dacă nu chiar imposibil, ca substanța chimică să fie tratată biologic, dar poate ar merita să se repete testul cu nămol activ dintr-o altă sursă și/sau nămolul să fie supus unei aclimatizări mai treptate.

3. Dimpotrivă, atunci când substanța chimică testată este bioeliminată la prima încercare în testul de simulare, concentrația sa trebuie să fie crescută în cazul în care trebuie să se cunoască dacă substanța chimică ar putea fi inhibitoare.

4. La determinarea gradelor de inhibiție, trebuie să se rețină faptul că populația din nămolul activ se poate schimba, astfel încât în timp microorganismele pot dezvolta o toleranță față de substanța chimică inhibitoare.

5. Calculul gradului de inhibiție:

Procentele generale de înlăturare R_o a CBO, COD, CCO etc. pentru unitățile de testare și de control se pot calcula cu formula:

$$R_o = 100(I - E)/I\%$$

unde:

I = concentrația în influent a CBO, COD, CCO etc. pentru vasele de testare sau de control (mg/l)

E = concentrațiile respective în efluent (mg/l)

I și E trebuie să fie corectate ținând seama de COD datorate substanței chimice testate din unitățile de testare, altfel calculele inhibiției procentuale vor fi incorecte.

▼**M4**

Gradul de inhibiție produs de prezența substanței chimice testate se poate calcula cu formula:

$$\% \text{ inhibiție} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

unde:

R_c = înlăturare procentuală în vasele de control

R_t = înlăturare procentuală în vasele de testare

BIBLIOGRAFIE:

(1) Reynolds L. *et al.* (1987), Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability, Chemosphere 16: 2259.

(2) Capitolul C.11 din prezenta anexă, „Biodegradare – Nămolul activ: Test de inhibiție a respirației”.

(3) ISO 8192 (2007) Calitatea apei – Test de inhibiție a consumului de oxigen al nămolului activ la oxidarea carbonului și amoniului.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Apendicele 5

Substanțe chimice testate puțin solubile în apă – substanțe chimice volatile

Substanțe chimice puțin solubile în apă

Se pare să s-au publicat puține rapoarte privind substanțele chimice puțin solubile și insolubile în apă supuse la teste care simulează tratarea apelor uzate (1) (2) (3).

Nu există o metodă unică de dispersie a substanței chimice testate care să poată fi aplicată la toate substanțele chimice insolubile. Două din cele patru tipuri de metode descrise în ISO 10634 (4) par potrivite pentru încercarea de a dispersa substanțele chimice testate pentru testul de simulare; este vorba despre utilizarea agenților de emulsifiere și/sau a energiei ultrasonice. Trebuie să se determine stabilitatea dispersiei rezultate, pe perioade de cel puțin 24 de ore. Apoi, dispersiile stabilizate corespunzător, conținute într-un rezervor cu amestecare continuă (punctul 38), trebuie să fie adăugate într-un vas de aerare, separat de apele uzate menajere (sau sintetice).

Dacă dispersiile sunt stabile, se analizează modul în care substanța chimică testată se poate determina în formă dispersată. Este puțin probabil ca COD să fie adecvat, astfel încât trebuie să se stabilească o metodă analitică specifică, ce poate fi aplicată efluenților, substanțelor solide din efluenți și nămolului activ. Evoluția substanței chimice testate în simularea procesului cu nămol activ se determină apoi în fazele lichidă și solidă. Astfel, se stabilește un „bilanț masic” pentru a decide dacă substanța chimică testată a fost biodegradată. Totuși, aceasta ar indica doar biodegradarea primară. Demonstrarea biodegradării finale trebuie să fie încercată prin aplicarea unui test respirometric pentru biodegradabilitate rapidă [capitolul C.4 din prezenta anexă (5) C, F sau D], utilizând ca inocul nămol expus substanței chimice testate în testul de simulare.

Substanțe chimice volatile

Aplicarea simulărilor privind tratarea apelor uzate la substanțe chimice volatile este în egală măsură discutabilă și problematică. La fel ca în cazul substanțelor chimice testate puțin solubile în apă, s-au publicat foarte puține rapoarte care descriu testele de simulare cu substanțe chimice volatile. Un tip convențional de aparat de amestecare completă este adaptat prin etanșarea vaselor de aerare și decantare, măsurarea și controlul fluxului de aer cu ajutorul unor debitmetre și trecerea gazului evacuat prin separatoare, pentru a colecta materiile organice volatile. În unele cazuri se folosește o pompă de vid pentru extragerea gazului evacuat printr-un separator „rece” sau un separator de purjare care conține Tenax și silicagel pentru analize de cromatografie în fază gazoasă. Substanța chimică testată prezentă în separator poate fi determinată prin metodă analitică.

Testul se efectuează în două etape. Mai întâi, unitățile funcționează fără nămol, dar cu apă uzată sintetică plus substanța chimică testată care este pompată în vasul de aerare. Se prelevează probe din influent, efluent și gazul evacuat, care sunt analizate timp de câteva zile pentru determinarea substanței chimice testate. Din datele colectate, se poate calcula procentul (R_{vs}) din substanța chimică testată eliminată din sistem.

Apoi se efectuează testul biologic (cu nămol), în condiții de funcționare identice cu cele din studiul privind striparea. Măsurătorile privind COD sau CCO se fac și pentru a verifica dacă unitățile funcționează eficient. Ocazional, se fac analize pentru a determina substanța chimică testată din influent, efluent și gazul evacuat în prima parte a testului; după aclimatizare se fac analize mai frecvente. Din nou, din datele în starea stabilă, se poate calcula procentul de înlăturare a substanței chimice testate din faza lichidă pentru toate procesele (R_T) (fizic și biologic), precum și proporția (R_V) eliminată din sistem.

▼**M4**

Calcul:

(a) în testul nebiologic, procentul (R_{VP}) de material de testare eliminat din sistem se poate calcula cu formula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

unde:

R_{VP} = înlăturarea substanței chimice testate prin volatilizare (%)

S_{VP} = substanța chimică testată colectată în separator, exprimată ca și concentrație echivalentă în faza lichidă (mg/l)

S_{IP} = concentrația de substanță chimică testată în influent (mg/l);

(b) în testul biologic, procentul (R_V) de material de testare eliminat din sistem se poate calcula cu formula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

unde:

R_V = înlăturarea substanței chimice testate prin volatilizare în testul biologic (%)

S_V = substanța chimică testată colectată în separator în testul biologic, exprimată ca și concentrație echivalentă în influentul lichid (mg/l)

S_I = concentrația de substanță chimică testată în influent (mg/l);

(c) în testul biologic, procentul (R_T) din substanța chimică testată înlăturată prin toate procesele este calculat cu formula:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

unde:

S_E = concentrația de substanță chimică testată în efluent (lichid) (mg/l);

(d) astfel, procentul (R_{BA}) înlăturat prin biodegradare plus adsorbție se poate calcula astfel:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Trebuie să se facă teste separate, pentru a determina dacă substanța chimică testată este adsorbită; dacă da, atunci se poate face o corecție ulterioară;

(e) o comparație între proporția de substanță chimică testată înlăturată din sistemele de testare biologică (R_v) și nebiologică (R_{vp}) indică efectul general al tratării biologice asupra emisiei de substanță chimică testată în atmosferă.

Exemplu: Benzen

Timp de retenție a nămolului = 4 zile

Apă uzată sintetică; timp de retenție = 8 ore

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Astfel,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % și R_{BA} = 85 %.

S-a presupus că benzenul nu este adsorbit în nămol.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970), Biological degradation of tertiary butyl alcohol, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990), Biodegradability of organic substances in the aquatic environment, CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983), Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters, J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Calitatea apei. Ghid pentru pregătirea și tratarea compușilor organici greu solubili în apă în vederea evaluării biodegradabilității lor în mediu apos.

(5) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide»”.

▼M4

Apendicele 6

Efectele timpului de retenție a nămolului (TRN) asupra tratabilității substanțelor chimice

INTRODUCERE

1. Metoda descrisă în textul principal a fost concepută pentru a verifica dacă substanțele chimice testate (de obicei cele cunoscute ca fiind inerent, dar nu ușor, biodegradabile) pot fi biodegradate în limitele impuse în cadrul stațiilor de epurare a apelor uzate. Rezultatele sunt exprimate ca procent de înlăturare și procent de biodegradare. Condițiile de exploatare a unităților cu nămol activ și alegerea influentului permit variații destul de mari ale concentrației substanței chimice testate în efluent. Testele sunt efectuate doar la o singură concentrație nominală de substanțe solide în nămol sau la un timp nominal de retenție a nămolului (TRN), iar regimurile de înlăturare a surplusului de nămol descrise pot face ca valoarea TRN să varieze considerabil în timpul testului, atât de la o zi la alta, cât și pe durata unei zile.

2. În această variantă (1) (2), TRN este controlat în limite mult mai restrânse pe fiecare perioadă de 24 de ore (la fel cum se întâmplă și pe scară largă), ceea ce conduce la o concentrație mai puțin variabilă în efluenți. Se recomandă apa uzată menajeră, întrucât conduce la procente de înlăturare mai mari și mai consecvente. De asemenea, sunt analizate efectele unei serii de valori ale TRN, iar în cadrul unui studiu mai detaliat se pot determina efectele unui interval de temperaturi asupra concentrației efluentului.

3. Încă nu s-a ajuns la un consens general privind modelele cinetice care trebuie să fie utilizate în cazul degradării substanțelor chimice în condițiile tratării apelor uzate. S-a utilizat modelul Monod de creștere bacteriană și utilizare a substratului (1) (2), pentru a fi aplicat la datele colectate, întrucât metoda a fost concepută pentru a fi aplicată doar la substanțele chimice produse în cantități mari, ducând la concentrații de peste 1 mg/l în apele uzate. Valabilitatea modelului simplificat și ipotezele adoptate au fost stabilite cu ajutorul unei serii de alcooli etoxilați cu diverse grade de biodegradabilitate primară (2) (3).

Notă: Această variantă de metodă respectă în mare măsură textul metodei de testare din C.10-A, prin urmare în continuare se indică mai jos doar detaliile care diferă.

PRINCIPIUL TESTULUI

4. Unitățile de tip vas poros cu nămol activ, concepute pentru a facilita înlăturarea (aproape) continuă de soluții apoase mixte care permit un control foarte precis al timpului de retenție a nămolului (TRN sau θ_s), sunt exploatate în regim de instalații necuplate, într-un interval de TRN și – opțional – într-un interval de temperaturi. De obicei, timpul de retenție este cuprins între 2 și 10 zile, iar temperatura între 5 și 20 °C. Apa uzată, de preferință menajeră, și o soluție din substanța chimică testată sunt dozate separat în unități, în ritmul necesar pentru a obține timpul necesar de retenție în apele uzate (3 până la 6 ore) și concentrația necesară a substanței chimice testate în influent. Unitățile de control care nu primesc substanța chimică testată sunt exploatate în paralel, în scop comparativ.

5. Se pot utiliza și alte tipuri de aparate, dar trebuie să se acorde mare atenție pentru asigurarea unui control corespunzător asupra TRN. De exemplu, atunci când se utilizează instalații cu decantor integrat ar putea fi necesar să se ia în considerare pierderea de substanțe solide prin efluentul instalației. În plus, trebuie să se ia măsuri speciale de precauție pentru a evita erorile datorate variației cantității de nămol în decantor.

▼M4

6. Unitățile sunt exploatate la fiecare set de condiții selectat și, după ce s-a atins un echilibru, sunt obținute concentrațiile medii în stare stabilă în efluentul substanței chimice testate și, opțional, COD, pe o perioadă de circa trei săptămâni. În afară de evaluarea procentului de înlăturare a substanței chimice testate și, opțional, a COD, relația dintre condițiile de funcționare în instalație și concentrația în efluent este exprimată în formă grafică. De aici se pot calcula constantele cinetice experimentale și se pot prevedea condițiile în care poate fi tratată substanța chimică testată.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

7. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 12 și 13.

NIVELURI DE TRECERE

8. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 14 și 15.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

9. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 16.

REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

10. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 17 și 18.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

11. O unitate adecvată este sistemul cu vas poros modificat (apendicele 6.1). El constă într-un vas interior (sau căptușeală) construit din polipropilenă poroasă de 3,2 mm grosime și cu pori de circa 90 μm diametru, ansamblul fiind sudat în partea inferioară. (Prin această metodă se obține o unitate mai robustă decât cea descrisă la punctul 21 din prezentul capitol C.10 A). Căptușeala este montată într-un vas exterior impermeabil, din polietilenă, format din două părți: o bază circulară în care sunt făcute găuri pentru a permite montarea a două furtunuri de aer și a unui furtun de înlăturare a surplusului de nămol și un cilindru superior care se înșurubează de baza circulară și care are un orificiu de evacuare plasat astfel încât în vasul poros să se obțină un volum cunoscut (3 l). Unul din furtunurile de aer este echipat cu o piatră de difuzare, iar celălalt este deschis la capăt și montat în unghi drept la piatra din vas. Acest sistem produce turbulența necesară pentru a asigura amestecarea completă a conținutului vasului, precum și pentru a obține concentrații de oxigen dizolvat mai mari de 2 mg/l.

12. Numărul corespunzător de unități este menținut la temperaturi controlate în intervalul de la 5 până la 20 °C (± 1 °C), fie în bazine cu apă, fie în încăperi cu temperatură constantă. Este nevoie de pompe pentru a doza alimentarea vaselor de aerare cu soluția de substanță chimică testată și cu apă uzată decantată la debitele cerute (0-1,0 ml/min, respectiv 0-25 ml/min) și de o a treia pompă pentru a înlătura nămolul rezidual din vasele de aerare. Debitul de curgere foarte scăzut necesar pentru nămolul rezidual este obținut prin utilizarea unei pompe reglate la un debit mai mare și care funcționează intermitent, cu ajutorul unui temporizator, de exemplu timp de 10 secunde pe minut, un debit de pompare de 3 ml/min conducând la o rată de pierdere a surplusului de nămol de 0,5 ml/min.

Aparat de filtrare sau centrifugă

13. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 23.

Echipamente pentru analiză

14. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 24.

Apă

▼M4

15. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 25 și 26.

Mediu organic

16. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 27.

Apă uzată sintetică

17. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 28.

Apă uzată menajeră

18. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 29.

Nămol activ

19. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctul 30.

Soluții stoc de substanță chimică testată

20. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 31 și 32.

PROCEDURĂ

Prepararea inoculului

21. Sunt valabile doar informațiile din capitolul C.10-A, punctul 34 – se folosește nămol activ (circa 2,5 g/l).

Număr de unități de testare

22. Pentru un test simplu, adică de măsurare a procentului de înlăturare, este nevoie de un singur TRN, dar pentru obținerea datelor necesare pentru calculul constantelor cinetice experimentale sunt necesare 4 sau 5 valori. De obicei, se aleg valori cuprinse între 2 și 10 zile. Practic, este convenabil să se facă un test la 4 sau 5 TRN simultan, la o singură temperatură; în studiile extinse, aceleași valori ale TRN sau poate o gamă de valori diferite se utilizează la alte temperaturi în intervalul 5-20 °C. Pentru biodegradarea primară (utilizarea principală), în mod normal este nevoie doar de o singură unitate pentru fiecare set de condiții. Totuși, pentru biodegradabilitatea finală este nevoie, pentru fiecare set de condiții, de o unitate de control care primește apă uzată, dar nu substanță chimică testată. Atunci când se crede că substanța chimică testată este prezentă în apa uzată utilizată, trebuie să se folosească unități de control la evaluarea biodegradării primare și să se facă toate corecțiile necesare în calcule.

Dozarea mediului organic și a substanței chimice testate

23. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 36-39, dar trebuie notat faptul că soluția de substanță chimică testată este dozată separat și că se folosesc diverse rate de pierdere a surplusului de nămol. De asemenea, se monitorizează și, dacă este necesar, se ajustează frecvent, de exemplu de două ori pe zi, la circa ± 10 %, debitele de curgere a influenților, efluenților și surplusului de nămol. În cazul în care apar dificultăți în metodele analitice la utilizarea apei uzate menajere, testul se efectuează cu apă uzată sintetică, dar trebuie să se asigure că mediile diferite duc la obținerea unor date cinetice comparabile.

Manipularea unităților cu nămol activ

24. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 40 și 43, dar TRN se controlează doar pentru pierderea „constantă” a nămolului.

Prelevare de probe și analiză

25. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 44 și 50, cu excepția faptului că este opțională determinarea concentrației de substanță chimică testată și COD; nu trebuie să se utilizeze CCO.

▼M4

DATE ŞI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

26. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 52-54.

Exprimarea rezultatelor testului

27. Sunt valabile informațiile din capitolul C.10-A, punctele 56-62.

Calculul constantelor cinetice

28. Este mai realist să se menționeze concentrația medie în stare stabilă a substanței chimice testate în efluent și să se descrie modul în care aceasta variază în funcție de condițiile de funcționare în instalație, decât să se menționeze biodegradarea primară procentuală. Aceasta se poate face prin considerarea ecuației 6 din apendicele 6.2, cu care se pot obține valori pentru K_S, μ_m și θ_{SC}, timpul critic de retenție a nămolului.

[Ca alternativă, se pot obține valori aproximative de K_S și μm cu ajutorul unui program de calculator simplu, pentru a potrivi curba teoretică rezultată din ecuația 2 (apendicele 6.2) cu valorile experimentale obținute. Cu toate că nicio substanță nu este unică, se poate obține o aproximare rezonabilă a K_S și μ_m.]

Variabilitatea rezultatelor

29. S-a observat experimental că pentru substanțe chimice individuale se obțin valori variabile ale parametrilor cinetici. Se consideră că valorile rezultate sunt influențate în mare măsură de condițiile de creștere a nămolului, precum și de condițiile preponderente în testul utilizat (ca la punctul 5 și în alte teste). Un aspect al acestei variabilități a fost discutat de Grady *et al.* (4), care au sugerat că termenii „extant” și „intrinsec” ar trebui să fie aplicați la două condiții extreme care reprezintă limitele stării fiziologice pe care o poate atinge o cultură în timpul unui experiment cinetic. Atunci când nu este permisă schimbarea stării în timpul testului, valorile parametrului cinetic reflectă condițiile din mediul din care au fost extrase microorganismele; aceste valori sunt numite „extant” sau valori existente în mod curent. La cealaltă extremă, atunci când condițiile de testare permit dezvoltarea completă a sistemului de sintetizare a proteinelor, care să permită o rată de creștere maximă, parametrii cinetici obținuți sunt numiți „intrinseci” și depind doar de natura substratului și de tipurile de bacterii din cultură. Orientativ, valorile extant vor fi obținute prin menținerea la o valoare scăzută a ratei de concentrare a substratului în microorganisme competente (S_o/X_o), de exemplu la 0,025, iar valorile intrinseci apare atunci când rata este ridicată, de exemplu de cel puțin 20. În ambele cazuri, S_o trebuie să fie egală sau mai mare decât valoarea relevantă a Ks, constanta de semi-saturare.

30. Variabilitatea și alte aspecte legate de cinetica biodegradării au fost discutate în cadrul unui grup de lucru recent al SETAC. Din astfel de studii, raportate și proiectate, ar trebui să se contureze o perspectivă mai clară asupra cineticii care funcționează în instalațiile de tratare a apelor uzate, pentru a permite o interpretare mai bună a datelor existente, precum și pentru a sugera conceperea unor metode de testare mai relevante în viitor.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Birch R.R. (1982), The biodegradability of alcohol ethoxylates, XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984), Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991), Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment, J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

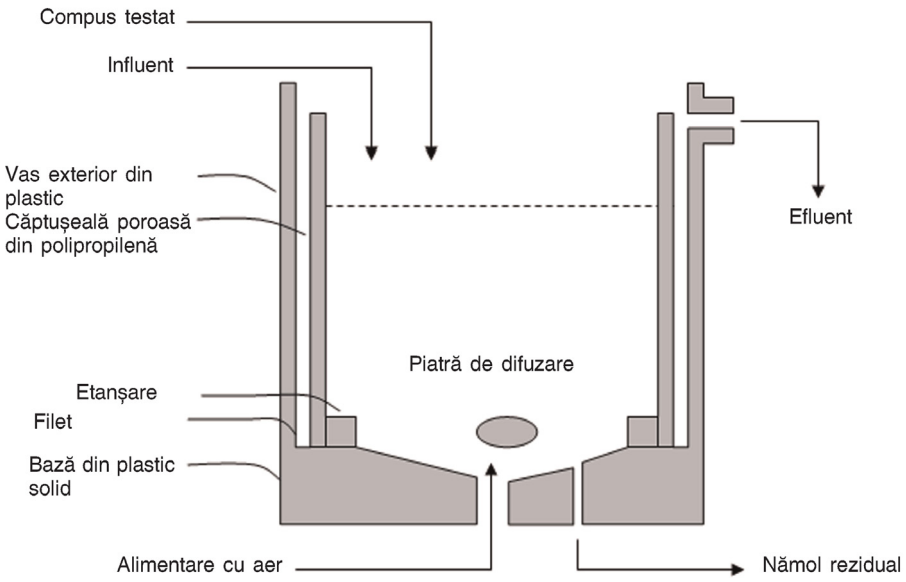
(4) Grady C.P.L., Smets B.F. and Barbeau D.S. (1996), Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology, Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997), Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4-6th Sept. 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼M4

Apendicele 6.1

Vas poros cu control al TRN



▼M4

Apendicele 6.2

Calculul constantelor cinetice

1. Pornind de la ipoteza aplicării cineticii Monod și considerând un bilanț masic de substanțe solide active și substrat în sistemul cu nămol activ (1), se pot obține următoarele expresii pentru starea stabilă:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

sau

$$S_l = \frac{K_s \cdot (1 + \mathrm{K_d} \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

unde:

S_1 = concentrația de substrat în efluent, (mg/l)

K_S = constanta de semi-saturare, concentrația la care $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = rata specifică de creștere (d^{-1})

μ_m = valoarea maximă a μ_m (d^{-1})

K_d = rata specifică de descompunere a substanțelor solide active (d^{-1})

θ_S = timpul mediu de retenție a nămolului, TRN (d)

Examinarea acestei ecuații conduce la următoarele concluzii:

(i) concentrația în efluent nu depinde de cea în influent (S_0); prin urmare, procentul de biodegradare variază în funcție de concentrația în influent, S_0;

(ii) singurul parametru de control al instalației care afectează S_1 este timpul mediu de retenție a nămolului, θ_S;

(iii) unei anumite concentrații în influent, S_0, îi va corespunde un timp critic de retenție a nămolului, astfel încât:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

unde:

θ_{SC} = timpul critic de retenție a nămolului, sub care microorganismele competente vor fi îndepărtate din instalație de apa care curge;

(iv) întrucât ceilalți parametri din ecuația 2 sunt asociați cu cinetica creșterii, temperatura poate afecta nivelul de substrat în efluent, iar vârsta critică a nămolului, adică timpul de retenție a nămolului necesar pentru obținerea unui anumit grad de tratare, ar crește odată cu scăderea temperaturii.

2. Din bilanțul masic al substanțelor solide în sistemul cu vas poros și în ipoteza că X_2, concentrația de substanțe solide în efluent, este scăzută comparativ cu cea din vasul de aerare, X_1, timpul de retenție a nămolului.

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

și

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

unde:

V = volumul vasului de aerare (l)

X_1 = concentrația de substanțe solide în vasul de aerare (mg/l)

X_2 = concentrația de substanțe solide în efluent (mg/l)

Q_0 = debitul influentului (l/zi)

Q_1 = debitul de nămol rezidual (l/zi)

Astfel, se poate controla timpul de retenție a nămolului la orice valoare prestabilită, prin controlul debitului de nămol rezidual, Q_1.

Concluzii

3. Prin urmare, scopul principal al testului este să permită prognozarea concentrației în efluent și astfel a nivelurilor de substanță chimică testată în apele care primesc substanța.

4. Prin trasarea graficului S_1 în funcție de θ_S, timpul critic de retenție a nămolului, θ_{SC}, poate fi evaluat rapid, de exemplu curba 3 din figura 1. Atunci când acest lucru nu este posibil, θ_{SC} poate fi calculat, împreună cu valorile aproximative ale μ_m și K_S, prin trasarea graficului S_1 în funcție de $S_1 \bullet \theta_S$.

Prin rearanjarea ecuației 1 se obține:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Atunci când K_d are o valoare mică, $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ și [5] devine:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Astfel, graficul ar trebui să fie o linie dreaptă (a se vedea figura 2) cu panta $1/\mu_m$ și ordonata la origine K_S/μ_m; de asemenea, $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Trei temperaturi; cinci TRN

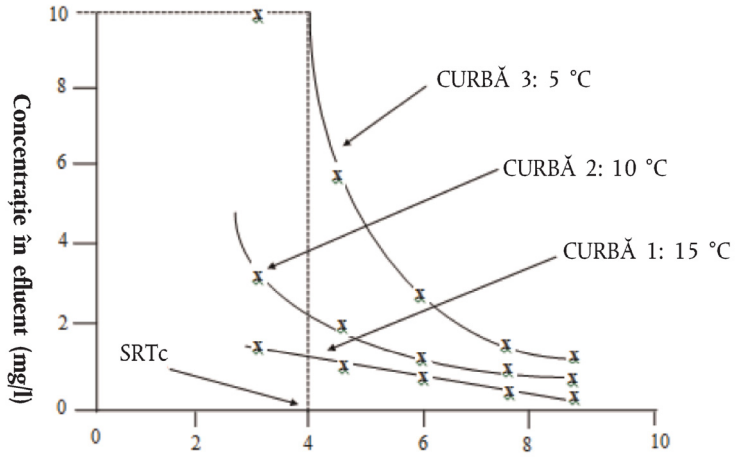
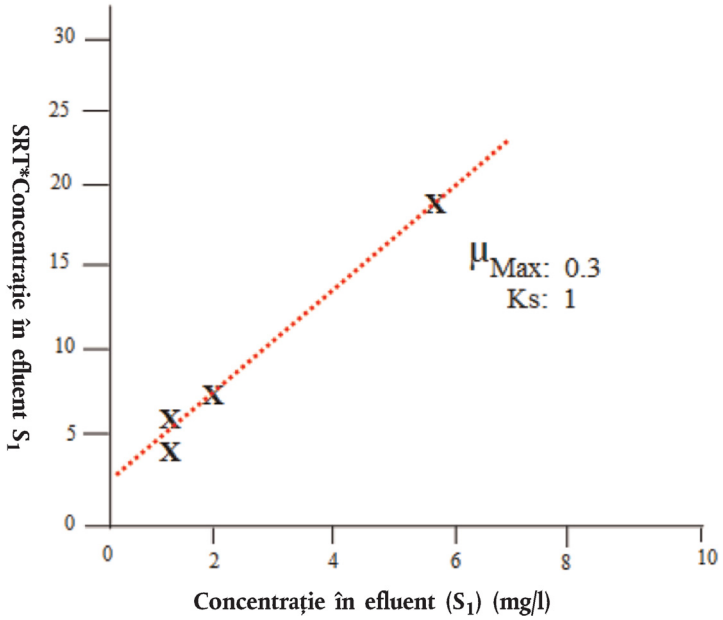


Figura 2

Linie de regresie TRN · S_1 în funcție de S_1 la T = 5 °C



Glosar:

Concentrație în efluent

Curbă

▼M4

Apendicele 7

TESTARE LA CONCENTRAȚII SCĂZUTE (μg/l)

1. În mod normal, în mediul acvatic sunt prezente multe substanțe chimice, chiar și în apele uzate, la concentrații foarte scăzute (μg/l). La astfel de concentrații probabil ele nu au rol de substraturi primare care conduc la creștere, dar sunt mai multe șanse să se degradeze sub formă de substraturi secundare, care nu determină creșterea, la concurență cu diverse substanțe chimice pe bază de carbon, care apar în mod natural. În consecință, degradările unor astfel de substanțe chimice nu se vor încadra în modelul descris în apendicele 6. Există multe modele care pot fi aplicate și, în condițiile predominante din sistemele de epurare a apelor uzate, pot funcționa simultan mai multe dintre ele. Pentru elucidarea acestei probleme vor fi necesare mult mai multe activități de cercetare.

2. Între timp, se poate urma procedura indicată în textul principal (capitolul C.10-A), dar numai pentru biodegradabilitatea primară, folosind concentrații scăzute corespunzătoare (< 100 μg/l) și o procedură analitică validată. Procentul de biodegradare poate fi calculat (a se vedea punctul 54 din metoda de testare), cu condiția să se ia în considerare procesele abiotice (adsorbție, volatilitate etc.). Un exemplu este studiul făcut de Nyholm și asociații săi (1) (2), utilizând un ciclu de 4 ore într-un sistem de încărcare-descărcare. Ei au raportat constante cinetice de pseudo-prim ordin pentru 5 substanțe chimice adăugate într-o apă uzată sintetică, la o concentrație între 5 și 100 μg/l. [Pentru biodegradabilitatea finală se pot utiliza substanțe chimice testate marcate cu C^{14}. O descriere a acestei metode depășește domeniul de aplicare al acestei metode de testare, întrucât nu există încă proceduri agreate, cu toate că o metodă propusă pentru ISO 14592 (3) conține orientări privind utilizarea substanțelor chimice marcate cu C^{14}.]

Testul SCAS

3. Ulterior s-a propus un test mai simplu, în două etape (4) (5) (6); metoda semicontinuă cu nămol activ (SCAS) este urmată de teste cinetice pe termen scurt pe probe prelevate din unitățile SCAS. Sistemul SCAS funcționează cu rate cunoscute de pierdere a surplusului de nămol (spre deosebire de metoda de testare originală C.12) și este alimentat cu o apă sintetică modificată față de formula indicată de OCDE sau cu apă uzată menajeră. Apa uzată sintetică a fost modificată (din cauza schimbării valorii pH-ului și a capacității scăzute de decantare a nămolului) prin adăugarea de fosfat ca soluție tampon, extract de drojdie, clorură ferică și săruri din microelemente, iar CCO-ul său a fost crescut la circa 750 mg/l, prin creșterea concentrației de peptonă și extract de carne. Instalațiile au funcționat într-un ciclu de 24 de ore: aerare timp de 23 de ore, înlăturarea surplusului de nămol, decantare, extragerea supernatantului (efluent), urmată de adăugarea de apă uzată sintetică plus substanța chimică testată, până la 100 μg/l (adică la aproximativ aceeași concentrație ca cea utilizată în testul de scurtă durată). O dată pe săptămână, 10 % din cantitatea totală de nămol a fost înlocuită cu nămol proaspăt, pentru a menține o populație microbiană echilibrată.

4. Se măsoară concentrațiile de substanță chimică testată de la început și de la sfârșitul operației de aerare și se continuă testul până ce se ajunge la înlăturarea unei cantități constante de substanță chimică testată; acest proces poate dura de la o săptămână până la câteva luni.

Test de scurtă durată

5. Un test scurt (de exemplu, de 8 ore) se aplică pentru a determina constanta cinetică de (pseudo) prim ordin pentru descompunerea substanței chimice testate în nămolul activ de origini și cu istorice cunoscute, dar diferite. În particular, se prelevează probe de nămol din reactoarele SCAS – la sfârșitul unei perioade aerobe în care concentrația de substrat organic este scăzută – în timpul unui experiment de aclimatizare (punctele 3, 4). De asemenea, nămolul se poate preleva dintr-o instalație paralelă SCAS care nu este expusă substanței chimice testate, pentru comparație. Amestecurile de nămol și

▼M4

substanță chimică testată adăugate la două sau mai multe concentrații în intervalul 1-50 µg/l sunt aerate, fără să se adauge apă uzată sintetică sau un alt substrat organic. Substanța chimică testată care rămâne în soluție se determină la intervale regulate, de exemplu la fiecare oră, în funcție de capacitatea de degradare a substanței chimice, pe o perioadă care să nu depășească 24 de ore. Probele sunt centrifugate înainte de a face analiza corespunzătoare.

Calcule

6. Datele provenite de la instalațiile SCAS sunt utilizate pentru calculul procentului de înlăturare a substanței chimice testate (punctul 54). De asemenea, se poate calcula o constantă de rată medie, K_1, (normalizată pentru concentrația de materii solide în suspensie), cu formula:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

unde:

t = timpul de aerare (23 h)

C_e = concentrația la sfârșitul perioadei de aerare (µg/l)

C_i = concentrația la începutul perioadei de aerare (µg/l)

SS = concentrația de substanțe solide în nămolul activ (g/l)

7. La testul de scurtă durată se trasează curba logaritmică a concentrației (%) în funcție de timp, iar panta părții inițiale (degradare de 10-50 %) a curbei este echivalentă cu K_1, constanta cinetică de (pseudo) prim ordin. Constanta este normalizată în funcție de concentrația de substanțe solide în nămol, prin divizarea pantei la concentrația de substanțe solide în nămol. Rezultatul raportat trebuie să includă și detalii privind concentrațiile inițiale ale substanței chimice testate și ale materiilor solide în suspensie, timpul de retenție a nămolului, încărcarea și sursa nămolului, precum și detalii privind expunerea anterioară la substanța chimică testată (dacă este cazul).

Variabilitatea rezultatelor

8. Variabilitatea și alte aspecte legate de cinetica biodegradării au fost discutate în cadrul unui grup de lucru recent al SETAC (7). Din astfel de studii, raportate și proiectate, ar trebui să se contureze o perspectivă mai clară asupra cineticii care funcționează în instalațiile de tratare a apelor uzate, pentru a permite o interpretare mai bună a datelor existente, precum și pentru a sugera conceperea unor metode de testare mai relevante în viitor.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A. și Schultz B. (1992), Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors, Biodegradability Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. și Ostfeldt P. (1993), Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption, Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998), Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P. și Frimer-Larsen H. (1996), Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T. și Nyholm N. (1996), Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations, Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency (1996), Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm N., Berg U.T., Ingerslev F., Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., și Verstraete W., 4-6th Sept. 1996. SETAC – Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biopelicule

INTRODUCERE

1. În mod normal, testele de simulare se aplică la substanțele chimice care nu au trecut testul de screening pentru biodegradabilitate rapidă [capitolul C.4 A-F din prezenta anexă (9)], dar au trecut testul pentru biodegradabilitate intrinsecă. În mod excepțional, se aplică teste de simulare și la orice substanțe chimice despre care sunt necesare mai multe informații, în special cele de mare tonaj, și în mod normal se aplică testul cu nămol activ (C.10-A). În unele situații, totuși, este nevoie de informații specifice referitoare la comportamentul unei substanțe chimice față de metodele de epurare a apelor uzate care presupun utilizarea de biopelicule, mai precis filtre de percolare, contactori biologici rotativi, straturi fluidizate. Pentru îndeplinirea acestei cerințe au fost dezvoltate diverse dispozitive.

2. Gerike *et al.* (1) au folosit filtre de percolare mari, la scară pilot, pe care le-au utilizat în regim cu instalații cuplate. Aceste filtre ocupau mult spațiu și aveau nevoie de volume relativ mari de apă uzată sau apă uzată sintetică. Truesdale *et al.* (2) au descris filtre mai mici (diametru 6 picioare și 6 țoli), care au fost alimentate cu apă uzată naturală fără agenți tensioactivi, dar încă mai era nevoie de volume relativ mari. A fost nevoie de nu mai puțin de 14 săptămâni pentru dezvoltarea unei biopelicule „mature” și încă 4-8 săptămâni după prima introducere de agent tensioactiv de testare, înainte să aibă loc aclimatizarea.

3. Baumann *et al.* (3) au dezvoltat un filtru mult mai mic, care folosea material din poliester tip „fleece”, scufundat în prealabil în nămol activ, ca mediu inert de suport al biopeliculei. Substanța chimică testată a fost utilizată ca sursă unică de carbon, iar biodegradabilitatea a fost evaluată din măsurătorile carbonului organic dizolvat (COD) în influent și în efluent, precum și din cantitatea de CO_2 din gazul evacuat.

4. O abordare destul de diferită a fost cea adoptată de Gloyna *et al.* (4), care au inventat reactorul tubular rotativ. Pe fața internă a tubului rotativ a crescut o biopeliculă pe suprafața cunoscută, prin trecerea unui influent introdus prin partea superioară a tubului, înclinat la un unghi mic față de orizontală. Reactorul a fost utilizat pentru a studia biodegradabilitatea agenților tensioactivi (5), precum și pentru a analiza grosimea optimă a biopeliculei și difuzarea prin peliculă (6). Acești din urmă autori au dezvoltat în continuare reactorul, inclusiv prin modificarea sa pentru a putea determina nivelul de CO_2 în gazul evacuat.

5. Reactorul tubular rotativ a fost adoptat de Comitetul permanent al analiștilor (Regatul Unit), ca metodă standard de evaluare atât a biodegradabilității substanțelor chimice (7), cât și a tratabilității și toxicității apelor uzate (8). Metoda descrisă aici prezintă avantajul de a fi simplă, compactă, reproductibilă și de a avea nevoie de volume de mediu organic relativ mici.

PRINCIPIUL TESTULUI

6. Apa uzată sintetică și menajeră și substanța chimică testată, în amestec sau separat, sunt aplicate pe suprafața internă a unui tub înclinat cu rotație lentă. Pe suprafața internă se dezvoltă un strat de microorganisme, similar cu cel prezent pe mediile de biofiltrare. Condițiile de funcționare a reactorului sunt alese pentru a asigura o eliminare corespunzătoare a materiei organice și, dacă este necesar, oxidarea amoniului.

▼M4

7. Se colectează efluentul din tub și se decantează și/sau se filtrează înainte de analiza pentru determinarea carbonului organic dizolvat (COD) și/sau a substanței chimice testate, printr-o metodă specifică. Unitățile de control care nu primesc substanța chimică testată sunt exploatate în paralel, în aceleași condiții, în scop comparativ. Se consideră că diferența dintre concentrațiile de COD din influent în unitățile de testare și de control este datorată substanței chimice testate și metaboliților săi organici. Diferența este comparată cu concentrația substanței chimice testate adăugate (exprimată ca COD), pentru a determina eliminarea substanței chimice testate.

8. În mod normal, se poate face distincția între biodegradare și bioadsorbție, prin examinarea atentă a curbei eliminare-timp. De obicei, confirmarea se poate obține prin aplicarea unui test de biodegradare rapidă (absorbție de oxigen sau producție de dioxid de carbon), folosind un inocul aclimatizat, prelevat la sfârșitul testului din reactoarele care primesc substanța chimică testată.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

9. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor, trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice testate.

10. În mod normal, substanțele chimice volatile și puțin solubile nu pot fi testate dacă nu se iau măsuri speciale de precauție (a se vedea apendicele 5 din capitolul C.10-A). Trebuie să se cunoască structura chimică sau cel puțin formula empirică, pentru a calcula valorile teoretice și/sau pentru a verifica valorile măsurate ale parametrilor, de exemplu consumul teoretic de oxigen (CTO), COD.

11. Informațiile legate de toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (a se vedea apendicele 4 din capitolul C.10-A) pot fi utile pentru alegerea concentrațiilor de testare adecvate și se pot dovedi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor de biodegradare scăzute.

NIVELURI DE TRECERE

12. Inițial, a fost necesar ca biodegradarea primară a agenților tensioactivi să ajungă la cel puțin 80 % înainte ca substanța chimică să poată fi comercializată. În cazul în care nu se atinge valoarea de 80 %, testul de simulare (de confirmare) poate fi aplicat, iar agentul tensioactiv se poate comercializa numai dacă s-a înlăturat mai mult de 90 % din substanța chimică specifică. În general, la substanțele chimice nu se pune problema de a trece sau a nu trece testul, iar valoarea înlăturării procentuale obținute poate fi utilizată în calcule aproximative ale concentrației probabile în mediu ce urmează să fie folosită în evaluarea riscurilor implicate de substanțe chimice. Într-o serie de studii privind substanțe chimice pure, s-a constatat că procentul de înlăturare a COD era > 90 % în mai mult de trei sferturi și > 80 % în peste 90 % din substanțele chimice, ceea ce a indicat un grad semnificativ de biodegradabilitate.

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

13. Pentru a asigura executarea corectă a procedurii experimentale, ocazional este util să se testeze substanțe chimice de referință, cu comportament cunoscut. Printre aceste substanțe se numără acidul adipic, 2-fenil-fenolul, 1-naftolul, acidul difenic și acidul 1-naftoic.

REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

14. Un laborator din Regatul Unit a constatat că deviația standard relativă în cadrul testelor este de 3,5 %, iar între teste este de 5 % (7).

▼M4

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Reactoare tubulare rotative

15. Aparatul (a se vedea figurile 1 și 2 din apendicele 8) este format dintr-o baterie de tuburi acrilice, fiecare cu lungime de 30,5 cm și cu diametru interior de 5 cm, care se sprijină pe roți cauciucate, montate într-un cadru de susținere metalic. Fiecare tub are o muchie exterioară, cu o adâncime de circa 0,5 cm, pentru a fi fixat pe roți, suprafața externă este înăsprită cu burete din sârmă, iar la capătul superior (de alimentare) este prevăzut cu o margine internă adâncă, cu rol de reținere a lichidului. Tuburile sunt înclinate la un unghi de aproximativ un grad față de orizontală, pentru a obține timpul de contact necesar atunci când mediul de testare este aplicat la un tub curat. Roțile cauciucate sunt rotite cu ajutorul unui motor cu viteză variabilă, lentă. Temperatura tuburilor este controlată prin instalarea într-o încăpere cu temperatura constantă.

16. Prin includerea fiecărui reactor tubular într-un tub ceva mai mare, acoperit, și asigurând etanșeitatea conexiunilor împotriva scurgerilor de gaze, gazul CO_2 evacuat poate fi colectat într-o soluție alcalină, pentru a fi măsurat ulterior (6).

17. Într-un vas de alimentare de 20 l se pune volumul de mediu organic necesar pentru 24 h, pentru fiecare tub, la care se adaugă substanța chimică testată, dacă este cazul. Dacă este necesar, soluția de substanță chimică testată poate fi dozată separat. Aproape de baza fiecărui vas de alimentare se află un orificiu de evacuare, conectat, prin tuburi adecvate (de exemplu, din cauciuc siliconic) și printr-o pompă peristaltică (B) la un tub de alimentare care pătrunde 2-4 cm în capătul superior (de alimentare) al tubului inclinat (C). Efluentul se lasă să se scurgă din partea inferioară a tubului înclinat, pentru a fi colectat într-un alt vas de alimentare (D). Înainte de analiză, efluentul se decantează sau se filtrează.

Aparat de filtrare – centrifugă

18. Dispozitiv de filtrare a probelor, cu filtre cu membrană de porozitate corespunzătoare (diametrul deschiderii nominale de 0,45 μm), care adsorb substanțele chimice organice solubile sau eliberează carbon organic la un nivel minim. Atunci când se utilizează filtre care eliberează carbon organic, ele trebuie să fie spălate cu grijă cu apă caldă, pentru a înlătura carbonul organic lixiviabil. Se poate utiliza și o centrifugă care poate asigura o accelerație de 40 000 m/s^2.

19. Echipamente de analiză pentru a determina:

— COD/carbonul organic total (COT) sau consumul chimic de oxigen (CCO);

— substanțe chimice specifice (HPLC, GC etc.) dacă este necesar;

— pH-ul, temperatura, aciditatea și alcalinitatea;

— conținutul de amoniu, nitriți și nitrați, în cazul în care testele se fac în condiții de nitrificare.

Apă

20. Apă de la robinet, cu conținut de COD mai mic de 3 mg/l.

21. Apă distilată sau deionizată, cu conținut de COD mai mic de 2 mg/l.

▼M4

Mediu organic

22. Ca mediu organic se poate utiliza apă uzată sintetică, apă uzată menajeră sau un amestec din cele două. S-a demonstrat că numai prin utilizarea apei uzate menajere se ajunge la un procent crescut de eliminare a COD (în instalațiile cu nămol activ) și chiar se permite biodegradarea unor substanțe chimice care nu sunt biodegradate atunci când se utilizează apa uzată sintetică indicată de OCDE. Astfel, se recomandă utilizarea apei uzate menajere. Trebuie să se măsoare concentrația de COD (sau CCO) în fiecare lot nou de mediu organic. Trebuie să se cunoască aciditatea sau alcalinitatea mediului organic. În cazul în care mediul organic are o aciditate sau alcalinitate scăzută, ar putea fi necesar să se adauge o soluție tampon corespunzătoare (bicarbonat de sodiu sau fosfat monoacid de potasiu), pentru a menține un pH de circa 7,5 ± 0,5 în reactor în timpul testului. Cantitatea de soluție tampon, precum și momentul adăugării sale se decid pentru fiecare caz în parte.

Apă uzată sintetică

23. În fiecare litru de apă de la robinet se dizolvă: peptonă, 160 mg; extract de carne, 110 mg; uree, 30 mg; fosfat acid de di-potasiu anhidru (K_2HPO4), 28 mg; clorură de sodiu (NaCl), 7 mg; clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfat de magneziu heptahidrat, ($MgSO_4.7H_20$), 2 mg. Această apă uzată sintetică din testele OCDE este un exemplu și indică o concentrație medie a COD în influent, de circa 100 mg/l. Ca metodă alternativă, se pot utiliza alte compoziții, cu aproximativ aceleași concentrații de COD, care sunt mai apropiate de apele uzate reale. Această apă uzată sintetică poate fi produsă din apă distilată într-o formă concentrată și poate fi depozitată la circa 1 °C până la o săptămână. Atunci când este nevoie să fie utilizată, se diluează cu apă de la robinet. (Acest mediu nu este satisfăcător, de exemplu concentrația de azot este foarte mare, conținutul de carbon este relativ scăzut, dar nu s-a sugerat o altă metodă mai bună, cu excepția adăugării unei cantități mai mari de fosfat, ca soluție tampon, și creșterii procentului de peptonă.)

Apă uzată menajeră

24. Se utilizează apă uzată proaspătă decantată, colectată zilnic dintr-o instalație de tratare care primește în special apă uzată menajeră. Apa trebuie să fie colectată din canalul deversor al rezervorului de sedimentare primară sau din alimentarea instalației de nămol activ și trebuie să fie, în mare măsură, lipsită de particule grosiere. Apa uzată poate fi utilizată după ce a fost depozitată timp de mai multe zile la circa 4 °C, dacă s-a dovedit că COD (sau CCO) nu a scăzut în mod semnificativ (adică la mai puțin de 20 %) în timpul perioadei de depozitare. Pentru a limita perturbațiile aduse sistemului, COD (sau CCO) din fiecare lot nou trebuie să fie ajustat înainte de utilizare la o valoare constantă adecvată, de exemplu prin diluarea cu apă de la robinet.

Lubrifiant

25. Pentru lubrifierea rolelor de ghidare de la pompa peristaltică se poate utiliza glicerină sau ulei de măsline; ambele fiind adecvate pentru tuburile din cauciuc siliconic.

Soluții stoc de substanță chimică testată

26. Pentru substanțe chimice cu solubilitate adecvată, se prepară soluții stoc de concentrații corespunzătoare (de exemplu, de la 1 până la 5 g/l) în apă deionizată sau în partea minerală a apei uzate sintetice. Pentru substanțele chimice insolubile, a se vedea apendicele 5 din capitolul C.10-A. Această metodă nu este potrivită pentru substanțe chimice volatile dacă nu se fac modificări la reactoarele tubulare (punctul 16). Se determină COD și COT din soluția stoc și se repetă măsurătorile pentru fiecare lot nou. În cazul în care diferența dintre COD și COT este mai mare de 20 %, se verifică solubilitatea în apă a substanței chimice testate. Se compară COD sau concentrația substanței chimice testate măsurate prin analiza specifică a soluției stoc cu valoarea

▼M4

nominală, pentru a verifica dacă recuperarea este suficient de bună (în mod normal se poate aştepta o valoare > 90 %). Se verifică, în special pentru dispersii, dacă COD poate fi utilizat sau nu ca parametru analitic sau dacă se poate utiliza doar o tehnică de analiză specifică pentru substanţa chimică testată. Pentru dispersii este necesară centrifugarea probelor. Pentru fiecare lot nou se măsoară COD, CCO ale substanţei chimice testate printr-o analiză specifică.

27. Se determină pH-ul soluţiei stoc. Valorile extreme indică faptul că adăugarea substanţei chimice poate avea o influenţă asupra pH-ului nămolului activ în sistemul de testare. În acest caz, soluţia stoc se neutralizează, pentru a obţine un pH de 7 ± 0,5, cu mici cantităţi de acid sau bază anorganică, dar se evită precipitarea substanţei chimice testate.

PROCEDURĂ

Prepararea mediului organic pentru dozare

28. Se asigură curăţarea temeinică a tuturor recipientelor pentru influent şi efluent şi a tuburilor de la vasele pentru influent şi către vasele pentru efluent, pentru a înlătura creşterea microbiană iniţială şi pe parcursul testului.

29. Apa uzată sintetică (punctul 23) se prepară proaspăt în fiecare zi, fie din substanţe solide, fie din soluţia stoc concentrată, prin diluare corespunzătoare cu apă de la robinet. Cantitatea necesară se măsoară într-un cilindru şi se adaugă într-un vas curat pentru influent. De asemenea, atunci când este nevoie, la apa uzată sintetică se adaugă, înainte de diluare, cantitatea necesară de soluţie stoc din substanţa chimică testată sau substanţa chimică de referinţă. Dacă este mai convenabil sau dacă este necesar pentru evitarea pierderilor de substanţă chimică testată, într-un rezervor separat se prepară o soluţie diluată separată din substanţa chimică testată, care este distribuită în tuburile înclinate printr-o altă pompă de dozare.

30. Ca soluţie alternativă (şi preferabilă), se poate utiliza apă uzată menajeră decantată (punctul 24), proaspăt colectată în fiecare zi, dacă este posibil.

Funcţionarea reactoarelor tubulare rotative

31. Pentru evaluarea unei substanţe chimice testate este nevoie de două reactoare tubulare identice; ele sunt asamblate într-o încăpere cu temperatură constantă, în mod normal la 22 ± 2 °C.

32. Pompele peristaltice se reglează pentru a debita 250 ± 25 ml/h de mediu organic (fără substanţă chimică testată) în tuburile înclinate, care sunt rotite la o viteză de 18 ± 2 rpm. Lubrifiantul (punctul 25) se aplică la tuburile pompei la început şi periodic, pe întreaga durată a testului, pentru a asigura funcţionarea corespunzătoare şi pentru a prelungi viaţa tuburilor.

33. Se reglează unghiul de înclinare a tuburilor la orizontală, în vederea obţinerii unui timp de rezidenţă de 125 ± 12,5 secunde, pentru alimentarea într-un tub curat. Se estimează timpul de retenţie prin adăugarea unui marker nebiologic (de exemplu, NaCl, vopsea inertă) la alimentare: timpul necesar pentru a atinge concentraţia maximă în efluent este considerat ca fiind timpul mediu de retenţie (atunci când pelicula este la grosime maximă, timpul de retenţie poate creşte până la circa 30 de minute).

34. S-a constatat că aceste debite, viteze şi timpi conduc la procente adecvate de înlăturare a COD (sau CCO) (> 80 %) şi determină obţinerea de efluenţi nitrificaţi. Debitul de curgere trebuie să fie modificat în cazul în care înlăturarea este insuficientă sau dacă trebuie să fie simulată performanţa unei anumite instalaţii de tratare. În acest din urmă caz se ajustează debitul de dozare a mediului organic până ce performanţa reactorului este egală cu cea a instalaţiei de tratare.

▼M4

Inoculare

35. Inocularea pe calea aerului poate fi suficientă pentru a începe creşterea microorganismelor, atunci când se utilizează apa uzată sintetică; în alte situaţii, se adaugă 1 ml/l de apă uzată decantată, timp de 3 zile.

Măsurători

36. La intervale regulate se verifică dacă debitele de dozare şi vitezele de rotaţie se încadrează în limitele necesare. De asemenea, se măsoară pH-ul efluentului, în special atunci când este de aşteptat să apară nitrificarea.

Prelevare de probe şi analiză

37. Metoda, tiparul şi frecvenţa de prelevare a probelor sunt alese pentru a corespunde scopului testului. De exemplu, se prelevează probe instantanee din influent şi din efluent sau se colectează probe pe o perioadă mai lungă, de exemplu 36 de ore. În prima perioadă, fără substanţa chimică testată, se prelevează probe de două ori pe săptămână. Probele se filtrează prin membrane sau se centrifughează la circa 40 000 m/sec^2, timp de aproximativ 15 minute (punctul 18). Poate fi necesară decantarea probelor şi/sau trecerea lor printr-un filtru cu pietriş înainte de filtrarea prin membrană. Se determină COD (sau CCO) cel puţin de două ori şi, dacă este necesar, CBO, conţinutul de amoniu şi nitrit/nitrat.

38. Toate analizele trebuie să fie efectuate imediat ce este posibil, după colectarea şi pregătirea probelor. În cazul în care trebuie să se amâne analizele, probele se depozitează la 4 °C, la întuneric, în sticle pline, închise etanş. Atunci când probele trebuie să fie depozitate mai mult de 48 de ore, ele se conservă prin congelare, acidifiere sau prin adăugarea unei substanţe toxice adecvate [de exemplu, 20 ml/l dintr-o soluţie de clorură de mercur (II) în concentraţie de 10 g/l]. Se asigură că tehnica de conservare nu influenţează rezultatul analizei.

Perioada de pornire

39. În această perioadă, biopelicula de suprafaţă creşte până ajunge la o grosime optimă, perioadă care durează de obicei 2 săptămâni şi nu trebuie să depăşească 6 săptămâni. Gradul de înlăturare (punctul 44) a COD (sau CCO) creşte şi atinge o valoare de platou. Atunci când nivelul de platou a ajuns la o valoare similară în ambele tuburi, unul dintre ele este selectat ca martor în restul testului, timp în care funcţionarea sa trebuie să se menţină în aceiaşi parametri.

Introducerea substanţei chimice testate

40. În această etapă se adaugă substanţa chimică testată la celălalt reactor, în concentraţia necesară, de obicei 1 020 mg C/l. Tubul martor continuă să primească doar mediul organic.

Perioada de aclimatizare

41. Analizele pentru COD (sau CCO) continuă de două ori pe săptămână şi, în cazul în care trebuie să se evalueze biodegradabilitatea primară, se măsoară concentraţia substanţei chimice testate prin analiză specifică. Pentru apariţia aclimatizării este nevoie să treacă o perioadă de una până la şase săptămâni (sau mai mult, în condiţii specifice) după prima introducere a substanţei chimice testate. Atunci când procentul de înlăturare (punctele 43-45) atinge o valoare maximă, trebuie să se obţină 12-15 valori valabile în faza de platou, timp de circa 3 săptămâni, pentru evaluarea procentului mediu de înlăturare. Testul se consideră complet atunci când s-a atins un grad de eliminare suficient de mare. În mod normal, durata testului nu trebuie să depăşească 12 săptămâni de la prima introducere a substanţei chimice testate.

▼M4

Desprinderea peliculei

42. Înlăturarea bruscă a unor cantități mari de peliculă în exces din tuburi, numită desprindere, are loc la intervale relativ regulate. Pentru a asigura că nu este afectat caracterul comparabil al rezultatelor, testele trebuie să acopere cel puțin două cicluri complete de creștere și desprindere.

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

43. Se calculează procentul de eliminare a COD (sau CCO) din substanța chimică testată, pentru fiecare evaluare într-un interval de timp, cu ecuația:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

unde:

D_t = procent de eliminare a COD (sau CCO) la momentul t

Cs = concentrația de COD (sau CCO) în influent, datorită substanței chimice testate, de preferință estimată din concentrația în soluția stoc și volumul adăugat (mg/l)

E = valoarea COD (sau CCO) măsurată în efluentul de testare la momentul t (mg/l)

Eo = valoarea COD (sau CCO) măsurată în efluentul de control la momentul t (mg/l)

Calculul se repetă pentru substanța chimică de referință, dacă este testată.

Funcționarea reactorului martor

44. Gradul de eliminare a COD (sau CCO) (D_B) din mediul organic în reactoarele martor este o informație utilă pentru evaluarea activității de biodegradare a biopeliculei în timpul testului. Se calculează procentul de eliminare cu ecuația:

$$D_B = 100(1 - E_o/C_m)\%$$

unde:

Cm = valoarea COD (sau CCO) a mediului organic în influentul de control (mg/l)

45. Se calculează înlăturarea (D_{ST}) substanței chimice testate, dacă este măsurată, cu o metodă analitică specifică la fiecare evaluare temporală, cu ecuația:

$$DST = 100(1 - Se/Si)\%$$

unde:

Si = concentrația măsurată sau, de preferință, estimată a substanței chimice testate în influentul de testare (mg/l)

Se = concentrația de substanță chimică testată măsurată în efluentul de testare la momentul t (mg/l)

▼M4

În cazul în care metoda analitică indică o valoare pozitivă în apa uzată nemodificată echivalentă cu S_c mg/l, se calculează procentul de eliminare (D_{SC}), cu formula:

$$DSC = 100(Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

Exprimarea rezultatelor testului

46. Se trasează graficul eliminării procentuale D_t și D_{ST} (sau D_{SC}, dacă este disponibilă), în funcție de timp (a se vedea apendicele 2 din capitolul C.10-A). Se calculează media (rotunjită la cel mai apropiat număr întreg) și deviația standard ale celor 12-15 valori pentru D_T (și pentru D_{ST}, dacă este disponibilă) obținute în faza de platou, ca procent de eliminare a substanței chimice testate. Din forma curbei de eliminare se pot trage unele concluzii privind procesele de eliminare.

Adsorbție

47. Dacă la începutul testului se observă un nivel ridicat de eliminare a COD din substanța chimică testată, probabil că substanța chimică testată este eliminată prin adsorbție pe biopeliculă. Acest lucru poate fi dovedit prin determinarea substanței chimice testate adsorbite pe solidele desprinse de pe peliculă. Nu este uzual ca nivelul de eliminare a COD din substanțele chimice adsorbabile să rămână ridicat pe toată durata testului; în mod normal, eliminarea este mai pronunțată la început, iar apoi scade treptat până la o valoare de echilibru. Totuși, dacă substanța chimică testată adsorbabilă a putut conduce la aclimatizarea populației microbiene, gradul de eliminare a COD din substanța chimică testată ar urma să crească ulterior, ajungând la o valoare de platou ridicată.

Fază de latență

48. La fel ca în cazul testelor statice de screening, pentru multe substanțe chimice testate este nevoie de o fază de latență înainte de apariția biodegradării totale. În faza de latență, aclimatizarea (sau adaptarea) bacteriilor competente are loc aproape fără nicio eliminare din substanța chimică testată; apoi apare creșterea inițială a acestor bacterii. Această fază se încheie, iar faza de degradare se consideră că începe, în mod arbitrar, atunci când este înlăturată circa 10 % din cantitatea totală de substanță chimică testată (după ce se lasă timp pentru adsorbție, dacă apare). Faza de latență este adesea foarte variabilă și slab reproductibilă.

Fază de platou

49. Faza de platou a unei curbe de eliminare dintr-un test continuu este definită ca fiind faza în care are loc degradarea maximă. Faza de platou trebuie să dureze cel puțin 3 săptămâni și să conțină circa 12-15 valori măsurate valabile.

Grad mediu de eliminare a substanței chimice testate

50. Se calculează valoarea medie din valorile de eliminare D_t (și D_{st}, dacă este disponibilă) ale substanței chimice testate în faza de platou. Rotunjit la cel mai apropiat număr întreg (1 %), reprezintă gradul de eliminare a substanței chimice testate. De asemenea, se recomandă calcularea intervalului de încredere de 95 % pentru valoarea medie. În mod similar, se calculează gradul mediu (D_B) de eliminare a mediului organic în vasul de control.

▼M4

Indicarea biodegradării

51. Dacă substanța chimică testată nu se adsoarbe în mod semnificativ pe biopeliculă și curba de eliminare are forma tipică a unei curbe de biodegradare cu faze de latență, degradare și platou (punctele 48, 49), eliminarea măsurată poate fi atribuită fără ezitare biodegradării. Dacă are loc o înlăturare inițială, testul de simulare nu poate face diferența între procesele de eliminare biologică și abiotică. În asemenea cazuri, precum și în alte cazuri în care există dubii privind biodegradarea (de exemplu, dacă are loc procesul de stripare), se analizează substanțele chimice testate adsorbite sau se efectuează teste statice (de screening) suplimentare pentru biodegradare, pe baza parametrilor care indică în mod clar procese biologice. Astfel de teste sunt metodele de absorbție de oxigen (capitolul C.4 D, E și F din prezenta anexă) (9) sau un test prin care se măsoară producția de CO_2 (capitolul C.4 C din prezenta anexă sau metoda Headspace) (10); ca inocul, se folosește biopeliculă preexpusă de la reactorul corespunzător.

52. Dacă s-au măsurat atât eliminarea COD, cât și eliminarea substanței chimice specifice, diferențele semnificative (prima fiind mai scăzută decât a doua) dintre procentele eliminate indică prezența de produse organice intermediare în efluenți, care pot fi mai dificil de degradat; acestea trebuie să fie analizate.

Validarea rezultatelor testelor

53. Testul este considerat valabil dacă gradul de eliminare a COD (sau CCO) (D_B) în unitățile de control este > 80 % după două săptămâni și nu s-au înregistrat observații neobișnuite.

54. În cazul în care s-a testat o substanță chimică ușor biodegradabilă (de referință), gradul de biodegradare trebuie să fie > 90 %, iar diferența dintre valorile pentru probe duplicat să nu fie mai mare de 5 %. Atunci când nu se respectă aceste două criterii, se revizuiesc procedurile experimentale și/sau se obține apă uzată menajeră din altă sursă.

55. Similar, diferențele dintre valorile de biodegradare de la unitățile duplicat (dacă se utilizează) care tratează o substanță chimică testată nu trebuie să difere cu mai mult de 5 %. Dacă nu se îndeplinește acest criteriu, dar procentele de eliminare sunt mari, se continuă analiza timp de trei săptămâni. În cazul în care gradul de eliminare este scăzut, se analizează efectele inhibitoare ale substanței chimice testate, dacă nu sunt cunoscute, și se repetă testul la o concentrație mai scăzută de substanță chimică testată, dacă acest lucru este posibil.

Raport de testare

56. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică testată:

— date de identificare;

— natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice.

Condițiile de testare:

— orice modificări ale sistemului de testare, în special atunci când se testează substanțe insolubile sau volatile;

— tipul mediului organic;

— proporția și natura apelor reziduale industriale prezente în apele uzate, dacă sunt utilizate și dacă se cunosc;

— metoda de inoculare;

▼M4

— conținutul de COD (carbon organic dizolvat) și COT (carbon organic total) în soluția stoc de substanță chimică testată; modul de preparare, dacă este în suspensie; concentrația (concentrațiile) de testare, motivul, dacă COD este în afara domeniului 10-20 mg/l; metoda de adăugare; data primei adăugări; orice modificări ale concentrației;

— timpul mediu de retenție hidraulică (fără creștere); viteza de rotație a tubului; unghiul de înclinare aproximativ, dacă este posibil;

— detalii privind desprinderea; durata și intensitatea;

— temperatura și domeniul de testare;

— tehnicile de analiză utilizate.

Rezultatele testului:

— toate datele măsurate pentru COD, CCO, analize specifice, pH, temperatură, substanțe azotoase, dacă sunt relevante;

— toate datele calculate privind D_t (sau D_{tc}), D_B, D_s obținute în formă de tabel și curbe de eliminare;

— informații privind fazele de latență și platou, durata de testare, gradul de eliminare a substanței chimice testate, a substanței chimice de referință (dacă este testată) și a mediului organic (în unitatea de control), împreună cu informații statistice și specificații privind biodegradabilitatea și valabilitatea testului;

— discutarea rezultatelor.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test, Wat. Res. 14: 753758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959), Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material, Wat. Waste Tr. J. 7: 441444.

(3) Baumann U., Kuhn G. and Benz M. (1998), Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952), Rotary tubes as experimental trickling filters, Sewage ind. Waste 24: 13551357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966), LAS removal across an institutional trickling filter, JAOCS 43: 9294.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966), Biological oxidation of sewage by films of microorganisms, Int. J. Air Wat. Pollut. 10: 865881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982), Methods for the examination of waters and associated materials, Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984), Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide»", A-F.

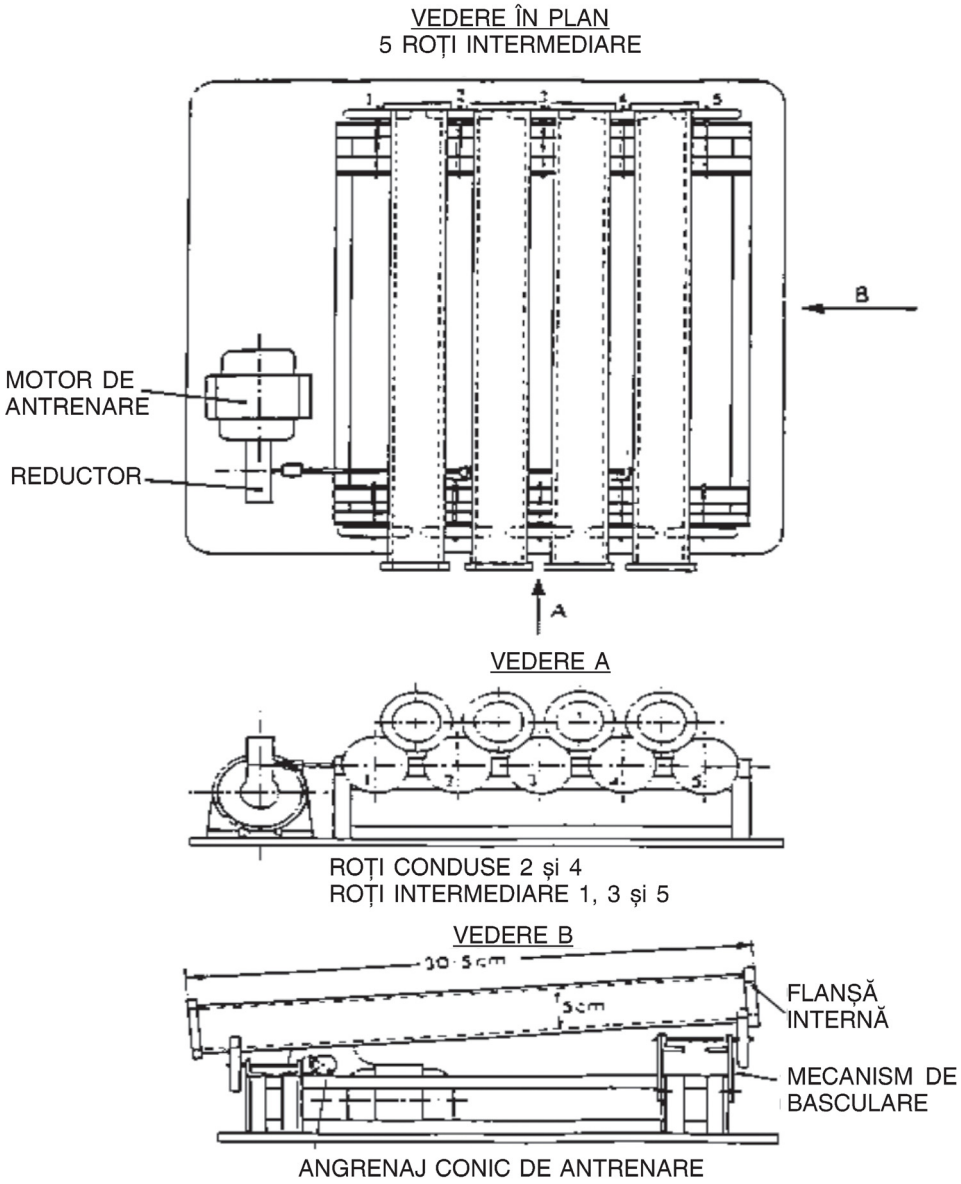
(10) ISO 14593 (1998), Calitatea apei. Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetic (Încercare cu CO_2 în spațiul superior).

▼**M4**

Apendicele 8

Figura 1

Tuburi rotative



Glosar:

Vedere în plan

Vedere A/B

Roți conduse

Roți intermediare

Motor de antrenare

Reductor

Flanșă internă

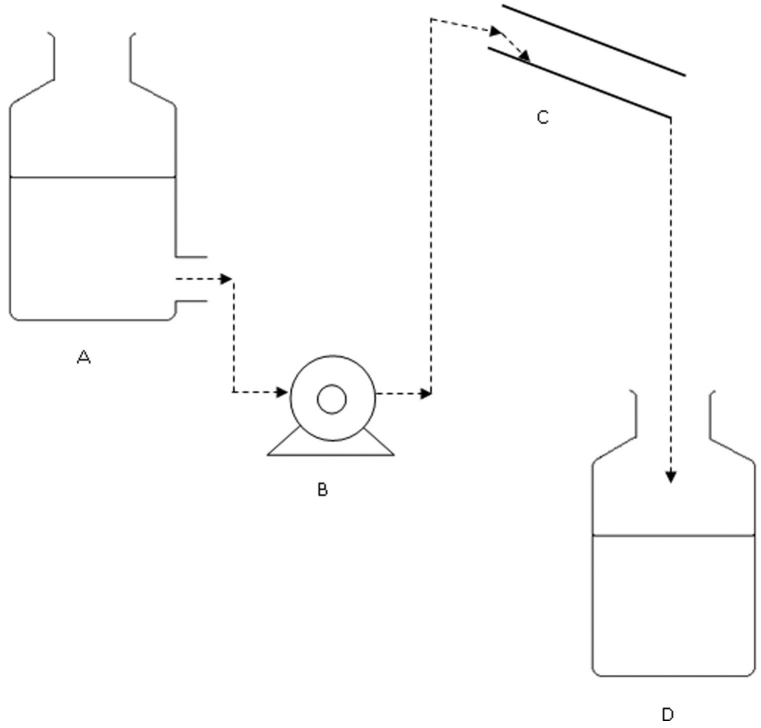
Mecanism de basculare

Angrenaj conic de antrenare

▼**M4**

Figura 2

Diagramă flux



A: Rezervor de alimentare

B: Pompă peristaltică

C: Tub rotativ

D: Vas colector al efluentului

DEFINIȚII

Substanță chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

Substanțe chimice: „Trebuie să se noteze faptul că termenul «substanță chimică» este utilizat pe scară largă în acordurile UNCED și documentele ulterioare, pentru a include substanțe, produse, amestecuri, preparate sau orice alți termeni care pot fi utilizați în sistemele existente pentru a indica acoperirea”.

▼M6

C.11. NĂMOL ACTIV, TEST DE INHIBARE A RESPIRAȚIEI (OXIDAREA CARBONULUI ȘI A AMONIULUI)

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 209 (2010). Această metodă de testare descrie o metodă de determinare a efectelor unei substanțe chimice asupra microorganismelor din nămolul activ (în mare parte bacterii) prin măsurarea vitezei de respirație (oxidarea carbonului și/sau a amoniului) în condiții definite, în prezența a diferite concentrații ale substanței chimice de testare. Metoda de testare se bazează pe testul ETAD – *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry* (Asociația ecologică și toxicologică a producătorilor de coloranți) (1) (2), pe Orientarea anterioară a OCDE TG nr. 209 (3) și pe standardul ISO 8192 revizuit (4). Obiectivul acestui test este furnizarea unei metode de evaluare rapide a efectelor substanțelor chimice asupra microorganismelor din nămolul activ în etapa biologică (aerobă) a stațiilor de epurare a apelor uzate. Rezultatele testului pot, de asemenea, să indice concentrațiile neinhibitorii ale substanțelor chimice de testare care se utilizează în testele de biodegradabilitate (de exemplu capitolele C.4 A-F, C.9, C.10, C12 și C.29 din prezenta anexă, Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 302C). În acest caz, testul poate fi realizat ca un test de depistare, similar unui test de stabilire a intervalului sau unui test la valori-limită (a se vedea punctul 39), luând în considerare numai respirația totală. Cu toate acestea, aceste informații trebuie luate în considerare cu precauție pentru testele de biodegradabilitate rapidă (capitolele C.4 A-F și C.29 ale prezentei anexe) pentru care concentrația inoculului este semnificativ mai scăzută decât cea utilizată în prezenta metodă de testare. Într-adevăr, absența inhibiției în acest test de respirație nu are ca rezultat automat condițiile neinhibitorii din testele de biodegradabilitate rapidă din capitolul C.4 A-F sau C.29 al prezentei anexe.

2. În general, testul de inhibare a respirației pare să fi fost aplicat cu succes de la prima sa publicare, însă în câteva cazuri au fost raportate rezultate eronate, de exemplu (2) (4) (5). Curbele de respirație în funcție de concentrație sunt uneori bifazice, graficele doză-răspuns au fost denaturate, iar valorile EC_{50} au fost neașteptat de scăzute (5). Cercetările au arătat că aceste rezultate apar atunci când nămolul activ utilizat pentru test este puternic nitrificant și când substanța chimică de testare are un efect mai puternic asupra oxidării amoniului decât asupra oxidării heterotrofe generale. Prin urmare, aceste rezultate eronate pot fi evitate prin realizarea unui test suplimentar utilizând un inhibitor specific al nitrificării. Prin măsurarea oxigenului consumat în prezența și în absența unui astfel de inhibitor, de exemplu N-aliltioureea (ATU), poate fi calculat separat consumul de oxigen total, heterotrof și legat de nitrificare (4) (7) (8). Astfel efectele inhibitorii ale unei substanțe chimice de testare asupra celor două procese pot fi determinate și valorile EC_{50} atât pentru oxidarea carbonului organic (heterotrofă), cât și pentru oxidarea amoniului (nitrificare) pot fi calculate prin metoda clasică. Trebuie avut în vedere că în anumite cazuri rare, efectul inhibitor al N-aliltioureei poate fi anulat parțial sau complet dacă aceasta formează complexe cu substanțele chimice de testare sau cu adjuvanții de mediu, de exemplu ioni Cu^{++} (6). Ionii Cu^{++} sunt esențiali pentru *Nitrosomonas*, dar sunt toxici în concentrații mai mari.

3. Nevoia de nitrificare pentru epurarea aerobă a apelor uzate, ca etapă necesară a procesului de eliminare a compușilor de azot din apele uzate prin denitrificarea în produse gazoase, a devenit urgentă în special în țările europene; UE a stabilit limite mai scăzute pentru concentrația de azot din efluenții tratați deversați în corpurile de apă receptoare ([1]).

([1]) Directiva 91/271/CEE a Consiliului din 21 mai 1991 privind tratarea apelor urbane reziduale. JO L 135, 30.5.1991, p. 40.

▼**M6**

4. În general metoda de evaluare doar a efectului asupra proceselor de oxidare a carbonului organic este adecvată. Totuși, în unele cazuri, pentru a interpreta rezultatele și a înțelege efectele este necesară o examinare a efectului doar asupra nitrificării sau a efectului asupra nitrificării și a oxidării carbonului organic separat.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

5. Vitezele de respirație ale probelor de nămol activ alimentate cu apă uzată sintetică sunt măsurate într-o celulă ermetică care conține un electrod de oxigen după o perioadă de contact de 3 ore. În funcție de un scenariu de expunere realist, ar putea fi adecvat un timp de contact mai îndelungat. Dacă substanța chimică de testare se degradează rapid, de exemplu abiotic prin hidroliză, sau este volatilă și concentrația nu poate fi menținută la un nivel adecvat, se poate utiliza suplimentar o perioadă de expunere mai scurtă, de exemplu de 30 de minute. Sensibilitatea fiecărui lot de nămol activ ar trebui verificată cu o substanță chimică de referință adecvată în ziua expunerii. Testul se utilizează în general pentru a determina EC_x (de exemplu, EC_{50}) a substanței chimice de testare și/sau a concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC).

6. Inhibarea consumului de oxigen al microorganismelor care oxidează carbonul organic poate fi exprimată separat de cea a microorganismelor care oxidează amoniul prin măsurarea vitezelor consumului de oxigen în absența și în prezența N-aliltioureei, un inhibitor specific al oxidării amoniului în nitrit de către bacteriile nitrificante din prima etapă. În acest caz, procentajul de inhibare a vitezei consumului de oxigen se calculează prin compararea vitezei consumului de oxigen în prezența unei substanțe chimice de testare cu viteza medie a consumului de oxigen al probelor de control care nu conțin nicio substanță chimică de testare, atât în prezența, cât și în absența inhibitorului specific, N-aliltioureea.

7. Orice consum de oxigen generat de procese abiotice poate fi detectat prin determinarea vitezei în amestecuri formate din substanța chimică de testare, apă uzată sintetică și apă, omițând nămolul activ.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

8. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor ar trebui să se cunoască identitatea (de preferat numărul CAS), numele (IUPAC), puritatea, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, volatilitatea și caracteristicile de adsorbție ale substanței chimice de testare. În mod normal, substanțele chimice volatile nu pot fi testate în mod adecvat fără luarea unor măsuri de precauție speciale (a se vedea punctul 21).

APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE

9. Metoda de testare poate fi aplicată substanțelor chimice solubile în apă, puțin solubile și volatile. Cu toate acestea, se poate să nu fie întotdeauna posibilă obținerea valorilor EC_{50} cu substanțe chimice cu solubilitate limitată, iar cu substanțe chimice volatile pot fi obținute rezultate valide numai cu condiția ca marea parte (de exemplu > 80 %) a substanței chimice de testare să rămână în amestecul de reacție la sfârșitul perioadei (perioadelor) de expunere. Atunci când există incertitudini referitoare la stabilitatea sau volatilitatea substanței chimice de testare, ar trebui prezentate date analitice suplimentare pentru a rafina concentrația EC_x.

▼M6

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

10. Substanțele chimice de referință ar trebui testate periodic pentru a se garanta fiabilitatea metodei de testare și a condițiilor de testare și pentru a verifica sensibilitatea fiecărui lot de nămol activ utilizat ca inocul microbian în ziua expunerii. Substanța chimică recomandată ca substanță chimică inhibitoare de referință este 3,5-diclorfenolul (3,5-DCP), întrucât este un cunoscut inhibitor al respirației și este utilizat în multe tipuri de teste de inhibare/toxicitate (4). Sulfatul de cupru (II) pentahidrat poate fi, de asemenea, utilizat ca substanță chimică de referință pentru inhibarea respirației totale (9). N-metilanilina poate fi utilizată ca inhibitor de referință specific al nitrificării (4).

CRITERII DE VALIDITATE ȘI REPRODUCTIBILITATE

11. Viteza consumului de oxigen al probelor de control neutre (fără substanță chimică de testare sau de referință) nu ar trebui să fie mai mică de 20 mg de oxigen per gram de nămol activ (greutatea uscată a solidelor în suspensie) pe oră. Dacă viteza este mai mică, testul ar trebui repetat cu nămol activ spălat sau cu nămol din altă sursă. Coeficientul de variație al vitezei consumului de oxigen la probele de control duplicate nu ar trebui să fie mai mare de 30 % la încheierea testului final.

12. În cadrul unui ring test internațional organizat în 2004 de ISO (4) utilizând nămol activ derivat din apele uzate menajere, s-a constatat că EC_{50} a 3,5-DCP este cuprinsă între 2 mg/l și 25 mg/l pentru respirația totală, între 5 mg/l și 40 mg/l pentru respirația heterotrofă și între 0,1 mg/l și 10 mg/l pentru respirația legată de nitrificare. Dacă EC_{50} a 3,5-DCP nu se încadrează în intervalul așteptat, testul ar trebui repetat cu nămol activ din altă sursă. EC_{50} a sulfatului de cupru (II) pentahidrat ar trebui să se încadreze în intervalul 53-155 mg/l pentru respirația totală (9).

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Vasele și aparatura de testare

13. Trebuie utilizate echipamentele obișnuite de laborator și următoarele:

(a) vase de testare – de exemplu, pahare Berzelius de 1 000 ml care să conțină 500 ml de amestec de reacție (a se vedea punctul 5 din fig. 1);

(b) celule și mijloace de fixare pentru măsurarea concentrației oxigenului dizolvat; un electrod de oxigen adecvat; o celulă ermetică care să conțină proba, fără spațiu gol și dotată cu un înregistrator (de exemplu, punctele 7, 8, 9 din fig. 1 din apendicele 2); alternativ, se poate utiliza un vas CBO cu adaptor de tip manșon pentru fixarea ermetică a electrodului de oxigen pe gâtul vasului (a se vedea fig. 2 din apendicele 3). Pentru a evita pierderea de lichid prin revărsare la introducerea electrodului de oxigen, se recomandă introducerea în prealabil a unei pâlnii sau a unui tub de sticlă prin manșon sau utilizarea unor vase cu margini evazate. În ambele cazuri, ar trebui utilizat un agitator magnetic sau o altă metodă de agitare, de exemplu, o sondă autoagitatoare;

(c) agitatoare și bare magnetice acoperite cu material inert, pentru utilizarea în camera de măsurare și/sau în vasele de testare;

(d) dispozitiv de aerare: dacă este necesar, ar trebui să se utilizeze aer comprimat care să treacă printr-un filtru adecvat pentru a îndepărta praful și uleiul și prin pisetele care conțin apă pentru umidificarea

▼M6

aerului. Conținutul vaselor trebuie aerat cu ajutorul pipetelor Pasteur sau al altor dispozitive de aerare care nu adsorb substanțele chimice. Se poate utiliza un agitator orbital cu o viteză orbitală cuprinsă între 150 și 250 rpm cu flacoane de 2 000ml, de exemplu, pentru a satisface cererea de oxigen a nămolului și a depăși dificultățile create de substanțele chimice care produc spumă în exces, care sunt volatile și, prin urmare, pierdute, sau care sunt dificil de dispersat atunci când sunt aerate prin barbotare cu aer. Sistemul de testare este format în general dintr-o serie de pahare aerate continuu și pregătite secvențial (de exemplu, la intervale de cca 10-15 minute), apoi analizate în mod secvențial. Poate fi utilizat, de asemenea, orice instrument care permite concomitent aerarea și măsurarea vitezei consumului de oxigen ale amestecurilor;

(e) pH-metru;

(f) centrifugă, centrifugă de laborator clasică pentru nămol cu capacitate de 10 000 m/s^2.

Reactivi

14. Pe parcursul întregului test se utilizează reactivi de puritate analitică.

Apă

15. Se utilizează apă distilată sau deionizată care să conțină sub 1mg/l de COD, cu excepția cazurilor în care se specifică utilizarea de apă fără clor de la robinet.

Apă uzată sintetică

16. Mediul ar trebui preparat astfel încât să conțină următorii constituenți în cantitățile specificate:

— peptonă	16 g
— extract de carne (sau un extract vegetal comparabil)	11 g
— uree	3 g
— clorură de sodiu (NaCl)	0,7 g
— clorură de calciu dihidrat ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— sulfat de magneziu heptahidrat ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— fosfat acid de potasiu anhidru (K_2HPO_4)	2,8 g
— apă distilată sau deionizată până la 1 litru.	

17. PH-ul acestei soluții trebuie să fie de 7,5 ± 0,5. Dacă mediul preparat nu se utilizează imediat, acesta ar trebui depozitat la întuneric la o temperatură cuprinsă între 0 °C și 4 °C timp de cel mult 1 săptămână sau în condiții care nu îi modifică compoziția. Trebuie avut în vedere că această apă uzată sintetică este de 100 de ori mai concentrată decât cea descrisă în raportul tehnic al OCDE „Metodă propusă pentru determinarea biodegradabilității agenților tensioactivi folosiți la detergenții sintetici” din 11 iunie 1976 și conține în plus fosfat acid dipotasic.

▼M6

18. În mod alternativ, componentele mediului pot fi sterilizate individual înainte de depozitare sau peptona și extractul de carne pot fi adăugate puțin înainte de efectuarea testului. Înainte de utilizare, mediul trebuie bine amestecat, iar pH-ul trebuie ajustat la 7,5 ± 0,5, dacă este cazul.

Substanța chimică de testare

19. Trebuie pregătită o soluție stoc pentru substanțele de testare ușor solubile în apă numai până la solubilitatea maximă în apă (precipitatele nu sunt acceptate). Substanțele puțin solubile în apă, amestecurile ale căror componente au solubilități diferite în apă și substanțele adsorbante trebuie cântărite direct în vasele de testare. În aceste cazuri, utilizarea soluțiilor stoc poate fi o alternativă dacă concentrațiile dizolvate ale substanțelor chimice de testare sunt determinate analitic în vasele de testare (înainte de adăugarea nămolului activ). Dacă se prepară fracțiuni adaptate la apă (WAF), este esențială și determinarea analitică a concentrațiilor dizolvate ale substanțelor chimice de testare în vasele de testare. Trebuie evitată utilizarea de solvenți organici, agenți de dispersie/emulgatori pentru îmbunătățirea solubilității. Ultrasonicarea soluțiilor stoc și agitarea prealabilă a suspensiilor, de exemplu peste noapte, sunt posibile atunci când sunt disponibile informații adecvate privind stabilitatea substanței chimice de testare în astfel de condiții.

20. Substanța chimică de testare poate afecta pH-ul din sistemul de testare. pH-ul amestecurilor tratate cu substanța chimică de testare ar trebui determinat înainte de efectuarea testului, în cadrul unui test preliminar, pentru a stabili dacă va fi necesară ajustarea pH-ului înainte de testul principal și din nou în ziua efectuării testului principal. Soluțiile/suspensiile apoase ale substanței chimice de testare trebuie neutralizate înainte de adăugarea inoculului, dacă este necesar. Cu toate acestea, având în vedere că neutralizarea poate modifica proprietățile chimice ale substanței chimice, pot fi efectuate, în funcție de scop, teste suplimentare pentru evaluarea efectului substanței chimice de testare asupra nămolului fără ajustarea pH-ului.

21. Efectele toxice ale substanțelor chimice volatile, în special în testele în care aerul este barbotat în sistem, pot avea intensități diferite din cauza pierderilor de substanță de pe parcursul perioadei de expunere. În cazul acestor substanțe sunt necesare măsuri de precauție precum efectuarea unei analize specifice ale substanțelor din amestecurile de control care conțin substanța și modificarea regimului de aerare.

Substanța chimică de referință

22. Dacă substanța chimică de referință utilizată este 3,5-diclorfenolul, se prepară o soluție de 1,00 g de 3,5-diclorfenol în 1 000 ml de apă (15). Pentru accelerarea dizolvării trebuie utilizată apă caldă/ultrasonicarea, soluția ajungând la volumul său final numai după răcirea la temperatura camerei. Trebuie asigurat totuși faptul că structura substanței chimice de referință nu este modificată. PH-ul soluției trebuie verificat și ajustat, dacă este necesar, cu NaOH sau H_2SO_4 până la un pH de 7-8.

23. Dacă substanța chimică de referință utilizată este sulfatul de cupru (II) pentahidrat, se utilizează concentrații de 58 mg/l, 100 mg/l și 180 mg/l (factor de 1,8). Substanța se cântărește direct în vasele de testare (29, 50 și 90 mg pentru un volum total de 500 ml). Apoi se dizolvă în 234 ml de apă de la robinet sterilizată în autoclavă. Sulfatul de cupru (II) pentahidrat este ușor solubil. Când se începe testul, se adaugă 16 ml de apă uzată sintetică și 250 ml de nămol activ.

▼M6

Inhibitor specific al nitrificării

24. Se prepară o soluție stoc de N-aliltiouree (ATU) cu o concentrație de 2,32 g/l. Adăugarea a 2,5 ml din această soluție stoc într-un amestec de incubare cu volum final de 500 ml are ca rezultat o concentrație de ATU de 11,6 mg/l (10^{-4}mol/l), despre care se știe că este suficientă (4) pentru a inhiba 100 % nitrificarea dintr-un nămol activ nitrificant care conține 1,5 g/l de solide în suspensie.

Probă de control abiotică

25. În unele condiții rare, o substanță chimică de testare puternic reductoare poate antrena un consum de oxigen abiotic măsurabil. În aceste cazuri sunt necesare probe de control abiotice pentru a face distincția între consumul de oxigen abiotic al substanței chimice de testare și respirația microbiană. Probele de control abiotice pot fi preparate prin eliminarea inoculului din amestecurile de testare. În mod similar, atunci când se realizează măsurători analitice de sprijin, pot fi incluse probe de control abiotice pentru a determina concentrația obținută pe parcursul etapei de expunere a testului, de exemplu, atunci când se utilizează soluții stoc de substanțe chimice puțin solubile în apă cu componente având solubilitate diferită în apă. În cazuri specifice, poate fi necesară prepararea unei probe de control abiotice cu inocul sterilizat (de exemplu prin autoclavare sau prin adăugarea de agenți toxici sterilizanți). Anumite substanțe chimice pot produce sau consuma oxigen numai dacă suprafața este destul de mare pentru reacție, chiar dacă pentru acest lucru au în mod obișnuit nevoie de o temperatură sau o presiune mult mai ridicată. În această privință, trebuie acordată o atenție specială substanțelor peroxidice. Un inocul sterilizat prezintă o suprafață mare.

Inocul

26. Pentru utilizare generală, nămolul activ se colectează la ieșirea sau aproape de ieșirea bazinului de aerare al unei stații de epurare a apelor uzate bine exploatate care este alimentată predominant cu ape uzate menajere. În funcție de scopul testului, pot fi utilizate și alte tipuri sau surse adecvate de nămol activ, de exemplu, nămolul crescut în laborator la concentrații adecvate de solide în suspensie cuprinse între 2 g/l și 4 g/l. Cu toate acestea, nămolurile provenind de la stații de epurare diferite pot prezenta caracteristici și sensibilități diferite.

27. Nămolul poate fi utilizat ca atare, însă particulele mari trebuie eliminate prin limpezire pentru o perioadă scurtă, 5-15 minute, și prin decantarea stratului superior de solide fine sau strecurare (de exemplu, sită de 1 mm^2). O altă variantă ar fi omogenizarea nămolului într-un blender timp de cca 15 secunde sau mai mult, însă trebuie acordată atenție forțelor de forfecare și modificărilor temperaturii care pot apărea în cazul perioadelor lungi de amestecare.

28. Spălarea nămolului este adesea necesară, de exemplu, dacă viteza de respirație endogenă este scăzută. Nămolul trebuie să fie mai întâi centrifugat pentru o anumită perioadă pentru a produce un lichid supernatant limpede și granule de solide din apa uzată, de exemplu 10 minute la cca 10 000 m/s^2. Lichidul supernatant se elimină, iar nămolul este repus în suspensie prin agitare în apă de la robinet fără clor. Această apă de spălare trebuie apoi eliminată prin recentrifugare. Procesul de spălare și centrifugare se repetă, dacă este necesar. Trebuie determinată masa uscată a unui volum cunoscut de nămol repus în suspensie, iar nămolul trebuie concentrat prin eliminarea lichidului sau diluat în apă de la robinet fără clor pentru a obține concentrația de solide necesară a nămolului, adică 3 g/l. Nămolul activ trebuie aerat

▼M6

în mod constant (de exemplu, 2 l/minut) la temperatura de testare și, dacă este posibil, trebuie utilizat în ziua colectării. Dacă acest lucru nu este posibil, nămolul trebuie alimentat zilnic cu apă uzată sintetică (50 ml de apă uzată sintetică/l de nămol activ) timp de încă două zile. Apoi nămolul este utilizat pentru test și rezultatele sunt acceptate ca fiind valabile, cu condiția să nu fi avut loc nicio modificare semnificativă a activității sale, evaluată prin intermediul vitezei de respirație heterotrofă endogenă și a vitezei de respirație legată de nitrificare.

29. În cazul în care pe parcursul incubației se produce spumă, pot apărea dificultăți în sensul că spuma și solidele din nămol pe care le conține se pot revărsa din vasele de aerare. Ocazional, formarea spumei poate fi cauzată pur și simplu de prezența apei uzate sintetice, însă, în cazul în care substanța chimică de testare conține un agent tensioactiv, acest fenomen trebuie anticipat. Pierderea solidelor din nămolul din amestecurile de testare va avea ca rezultat viteze de respirație reduse artificial care ar putea fi interpretate greșit ca rezultat al inhibării. În plus, aerarea soluției de agenți tensioactivi concentrează acești agenți în stratul de spumă; pierderea spumei din sistemul de testare va reduce concentrațiile de expunere. Formarea spumei poate fi ținută sub control prin metode mecanice simple (de exemplu, agitarea manuală ocazională cu ajutorul unei tije de sticlă) sau prin adăugarea unui agent antispumant pe bază de emulsie siliconată fără agenți tensioactivi și/sau utilizarea metodei de aerare prin agitarea flaconului. Dacă problema este legată de prezența apei uzate sintetice, compoziția apei uzate trebuie modificată prin adăugarea unui reactiv antispumant într-o proporție de 50 µl/l, de exemplu. Dacă formarea spumei este cauzată de substanța chimică de testare, trebuie determinată cantitatea necesară pentru topirea spumei la concentrația maximă de testare, după care fiecare dintre vasele de aerare trebuie tratate în mod identic (inclusiv cele în care nu există spumă, cum ar fi probele de control neutre și vasele de referință). Dacă se utilizează agenți antispumanți, nu trebuie să existe nicio reacție cu inoculul și/sau cu substanța chimică de testare.

PROCEDURA DE TESTARE

30. Poate fi determinată inhibarea a trei tipuri de consum de oxigen: total, exclusiv heterotrof și legat de nitrificare. În mod normal, este adecvată măsurarea inhibării consumului total de oxigen. Efectele asupra consumului heterotrof de oxigen din oxidarea carbonului organic și din oxidarea amoniului sunt necesare atunci când există o cerință specifică privind calcularea acestor două efecte distincte pentru o anumită substanță chimică sau (opțional) pentru a explica curbele doză-răspuns atipice rezultate din inhibarea consumului total de oxigen.

Condițiile de testare

31. Testul ar trebui efectuat la o temperatură de 20 ± 2 °C.

Amestecurile de testare

32. Amestecurile de testare (F_T ca în tabelul 1) conținând apă, apă uzată sintetică și substanța chimică de testare se prepară astfel încât să se obțină diferite concentrații nominale ale substanței chimice de testare (a se vedea tabelul 1 pentru exemple de volum al constituenților). Dacă este necesar, pH-ul trebuie ajustat la 7,5 ± 0,5; se diluează amestecurile cu apă și se adaugă inoculul pentru a obține volume finale egale în vase și pentru a începe aerarea.

Amestecurile de referință

33. Amestecurile (F_R) trebuie preparate cu substanța chimică de referință, de exemplu 3,5-diclorfenol, în locul substanței chimice de testare, în același mod ca amestecurile de testare.

▼M6

Probele de control neutre

34. Probele de control neutre (F_B) ar trebui preparate la începutul și la sfârșitul perioadei de expunere pentru testele în care paharele de testare sunt pregătite secvențial la intervale regulate. În testele care utilizează echipamente care permit efectuarea de măsurători simultane ale consumului de oxigen, trebuie incluse cel puțin două probe de control neutre în fiecare lot de analiză simultană. Probele de control neutre conțin un volum egal de nămol activ și de mediu sintetic, însă nu conțin substanță chimică de testare sau de referință. Acestea trebuie diluate cu apă în același volum ca amestecurile de testare și de referință.

Proba de control abiotică

35. Dacă este necesar, de exemplu, dacă se știe sau se suspectează că o substanță chimică de testare are proprietăți reductoare puternice, trebuie preparat un amestec F_A pentru a măsura consumul abiotic de oxigen. Amestecul trebuie să conțină aceleași cantități de substanță chimică de testare și de apă uzată sintetică și același volum ca amestecurile de testare, însă fără nămol activ.

Procedură generală și măsurători

36. Amestecurile de testare, amestecurile de referință și probele de control neutre și abiotice se incubează la temperatura de testare în condiții de aerare forțată (0,5-1 l/min) pentru a păstra concentrația de oxigen dizolvat la o saturație de peste 60-70 % și pentru a menține flocoanele de nămol în suspensie. Agitarea culturilor este, de asemenea, necesară pentru a menține flocoanele de nămol în suspensie. Se consideră că incubarea începe odată cu contactul inițial dintre inoculul din nămolul activ și ceilalți constituenți ai amestecului final. La finalul incubării, după timpii de expunere specificați, în general de 3 ore, se extrag eșantioane pentru a măsura viteza de descreștere a concentrației de oxigen dizolvat în celula destinată acestui scop (fig. 2 din apendicele 3) sau în vasul CBO umplut complet. Modul în care încep incubările depinde și de capacitatea echipamentelor utilizate de a măsura viteza consumului de oxigen. De exemplu, dacă echipamentul cuprinde o singură sondă de oxigen, măsurătorile se realizează individual. În acest caz, se prepară diferitele amestecuri necesare pentru testarea în apă uzată sintetică însă fără a adăuga inoculul, iar cantitățile de nămol necesare se adaugă în fiecare vas din serie. Incubările se încep pe rând la intervale de timp adecvate de 10-15 minute, de exemplu. În mod alternativ, sistemul de măsurare poate cuprinde mai multe sonde care facilitează măsurătorile simultane multiple; în acest caz, inoculul poate fi adăugat în același timp în grupurile de vase adecvate.

37. Concentrația nominală de nămol activ din toate amestecurile de testare, de referință și neutre (dar nu și din probele de control abiotice) este de 1,5 g/l de solide în suspensie. Consumul de oxigen se măsoară după 3 ore de expunere. Dacă este cazul, se realizează măsurători după 30 de minute de expunere suplimentară, conform descrierii de la punctul 5 de mai sus.

Potențialul de nitrificare al nămolului

38. Pentru a stabili dacă nămolul nitrifică și, în caz afirmativ, cu ce viteză, trebuie preparate amestecuri (F_B) similare amestecurilor de control neutre și amestecuri „de control” suplimentare (F_N), dar care conțin și N-aliltiouree în concentrație de 11,6 mg/l. Amestecurile trebuie aerate și incubate la

▼M6

20 °C ± 2 °C timp de 3 ore. Apoi trebuie măsurată viteza consumului de oxigen și trebuie calculată viteza consumului de oxigen legat de nitrificare.

Protocoale de test

Testul de stabilire a intervalului

39. Atunci când este necesar, se utilizează un test preliminar pentru a estima intervalul concentrațiilor substanței chimice de testare necesare pentru un test final de determinare a inhibării consumului de oxigen. Alternativ, absența inhibării consumului de oxigen de către substanța chimică de testare într-un test preliminar poate demonstra inutilitatea unui test final, însă trebuie incluse triplicate la cea mai mare concentrație testată în testul preliminar (în general 1 000 mg/l, însă depinde de cerințele de date).

Tabelul 1

Exemple de amestecuri pentru testul preliminar

Reactiv	Concentrație originală				
Soluție stoc a substanței chimice de testare	10 g/l				
Soluție stoc de mediu sintetic	A se vedea punctul 16				
Suspensie stoc de nămol activ	3 g/l de solide în suspensie				
Componente ale amestecurilor	Doza din vasele de testare [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Soluție stoc a substanței chimice de testare (ml) (punctele 19-21)	0,5	5	50	0	50
Soluție stoc de apă uzată sintetică (ml) (punctul 16)	16	16	16	16	16
Suspensie de nămol activ (ml) (punctele 26-29)	250	250	250	250	0
Apă (punctul 15)	233,5	229	184	234	434
Volumul total al amestecurilor (ml)	500	500	500	500	500
Concentrațiile în amestec					
Suspensie de testare (mg/l) Nămol activ	10	10	1 000	0	1 000
(solide în suspensie) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Trebuie urmată aceeași procedură cu substanța chimică de referință pentru prepararea flacoanelor F_{R1-3}

40. Testul trebuie efectuat utilizând cel puțin trei concentrații ale substanței chimice de testare, de exemplu, 10 mg/l, 100 mg/l și 1 000 mg/l cu o probă de control neutră și, dacă este necesar, cel puțin trei probe de control abiotice cu cea mai mare concentrație a substanței chimice de

▼M6

testare (a se vedea drept exemplu tabelul 1). În mod ideal, concentrația cea mai scăzută nu ar trebui să aibă niciun efect asupra consumului de oxigen. Trebuie calculate vitezele de consum al oxigenului și viteza de nitrificare, dacă este relevantă; apoi se calculează procentajul de inhibare. În funcție de scopul testului, este de asemenea posibil să se determine doar toxicitatea unei concentrații-limită, de exemplu 1 000 mg/l. Dacă la această concentrație nu se produce niciun efect toxic semnificativ din punct de vedere statistic, nu mai sunt necesare alte teste la concentrații mai mari sau mai mici. Trebuie avut în vedere că substanțele puțin solubile în apă, amestecurile ale căror componente au solubilități diferite în apă și substanțele adsorbante trebuie cântărite direct în vasele de testare. În acest caz, volumul rezervat pentru soluția stoc de substanță de testare trebuie înlocuit cu apă de diluție.

Testul definitiv

Inhibarea consumului total de oxigen

41. Testul trebuie realizat utilizând un interval de concentrații dedus din testul preliminar. Pentru a obține atât o NOEC, cât și o EC_x (de exemplu EC_{50}), se recomandă, în cele mai multe cazuri, șase probe de control și cinci concentrații de tratare într-o serie geometrică având cinci probe duplicat. Proba de control abiotică nu trebuie repetată dacă în testul preliminar nu a existat consum de oxigen, însă, în cazul în care are loc un consum semnificativ, trebuie incluse probe de control abiotice pentru fiecare concentrație a substanței chimice de testare. Sensibilitatea nămolului se verifică utilizând substanța chimică de referință 3,5-diclorfenol. Sensibilitatea nămolului se verifică pentru fiecare serie de testare, deoarece se știe că sensibilitatea fluctuează. În toate cazurile, se extrag eșantioane din vasele de testare după 3 ore sau după 3 ore și 30 de minute, dacă este necesar, pentru a măsura viteza consumului de oxigen din celula cu electrod de oxigen. Din datele colectate, se calculează vitezele de respirație specifice ale amestecurilor de control și de testare; ulterior se calculează procentajul de inhibare utilizând ecuația 7 de mai jos.

Distincția dintre inhibarea respirației heterotrofe și nitrificare

42. Utilizarea inhibitorului specific al nitrificării, ATU, permite evaluarea directă a efectelor inhibitorii ale substanțelor chimice de testare asupra oxidării heterotrofe, iar prin scăderea vitezei consumului de oxigen în prezența ATU din viteza de consum totală (fără ATU) pot fi calculate efectele asupra vitezei de nitrificare. Se prepară două seturi de amestecuri de reacție, conform protocoalelor de test pentru EC_x sau NOEC descrise la punctul 41, dar se adaugă ATU în fiecare amestec dintr-un set, la o concentrație finală de 11,6 mg/l, care s-a demonstrat că inhibă complet nitrificarea în nămolul cu concentrații de solide în suspensie de până la 3 000 mg/l (4). Vitezele consumului de oxigen trebuie măsurate după perioada de expunere; aceste valori directe reprezintă doar respirația heterotrofă, iar diferențele dintre acestea și vitezele de respirație totale corespunzătoare reprezintă nitrificarea. Se calculează apoi diferitele grade de inhibare.

Măsurători

43. După perioada (perioadele) de expunere, un eșantion din primul vas de aerare trebuie transferat în celula cu electrod de oxigen (fig. 1 din apendicele 2), iar concentrația oxigenului dizolvat trebuie măsurată imediat. Dacă este disponibil un sistem cu mai mulți electrozi, măsurătorile se pot efectua simultan. Este esențială agitarea (cu ajutorul unui magnet acoperit) la aceeași viteză utilizată pentru calibrarea electrodului pentru a asigura faptul că sonda răspunde cu întârziere minimă la variațiile de concentrație a oxigenului și pentru a garanta regularitatea și reproductibilitatea măsurătorilor în vasul de măsurare. În general este adecvat sistemul cu sondă

▼M6

autoagitatoare format din câțiva electrozi de oxigen. Între măsurători, celula trebuie clătită cu apă. Alternativ, eșantionul poate fi folosit pentru umplerea unui vas CBO (fig. 2 din apendicele 3) prevăzut cu un agitator magnetic. Apoi trebuie introdusă o sondă de oxigen cu adaptor de tip manșon în gâtul vasului și trebui pornit agitatorul magnetic. În ambele cazuri, concentrația de oxigen dizolvat trebuie măsurată în mod continuu și înregistrată pentru o anumită perioadă, de obicei 5-10 minute, sau până când concentrația de oxigen scade sub 2 mg/l. Electrodul trebuie scos, amestecul trebuie turnat înapoi în vasul de aerare, continuând aerarea și agitarea, în cazul în care este necesară măsurarea după o perioadă mai lungă de expunere.

Verificarea concentrației substanței chimice de testare

44. Pentru anumite scopuri, poate fi necesară măsurarea concentrației substanței chimice de testare în vasele de testare. Trebuie avut în vedere că dacă se utilizează soluții stoc de:

— substanțe puțin solubile în apă;

— amestecuri ale căror componente au diferite solubilități în apă; sau

— substanțe cu solubilitate bună în apă, dar în cazul cărora concentrația soluției stoc este aproape de solubilitatea maximă în apă,

fracțiunea dizolvată nu se cunoaște, iar concentrația reală a substanței chimice de testare transferate în vasele de testare rămâne necunoscută. Pentru a caracteriza expunerea, este necesară o estimare analitică a concentrațiilor substanței chimice de testare în vasele de testare. Pentru a simplifica lucrurile, estimarea analitică trebuie făcută înainte de a adăuga inoculul. Din cauza faptului că numai fracțiunile dizolvate vor fi transferate în vasele de testare, concentrațiile măsurate pot fi foarte scăzute.

45. Pentru a evita analizele îndelungate și costisitoare, se recomandă simpla cântărire a substanței chimice de testare direct în vasele de testare și utilizarea concentrației nominale inițiale corespunzătoare acestei mase ca referință pentru calculele ulterioare. Nu este necesară o distincție între fracțiunile dizolvată, nedizolvată sau adsorbită ale substanței chimice, deoarece toate aceste fracțiuni apar și în condiții normale în stația de epurare a apelor uzate și pot varia în funcție de compoziția apelor uzate. Obiectivul acestei metode de testare este de a obține o estimare realistă a concentrației neinhibitoare și nu este adecvată pentru a studia în detaliu fracțiunile care contribuie la inhibarea organismelor din nămolul activ. În final, ar trebui cântărite direct în vasele de testare și substanțele adsorbante, iar vasele trebuie silanizate pentru a reduce la minimum pierderile prin adsorbție.

DATE ȘI RAPORT

Calculul vitezelor consumului de oxigen

46. Vitezele consumului de oxigen se calculează pornind de la media valorilor măsurate, de exemplu, pornind de la partea liniară a graficelor concentrației oxigenului în funcție de timp, limitând calculele la concentrațiile oxigenului cuprinse între 2,0 mg/l și 7,0 mg/l, întrucât concentrațiile mai mari și mai mici pot influența vitezele de consum. Incursiunea în benzile de concentrație superioare sau inferioare acestor valori este uneori inevitabilă și necesară, de

▼M6

exemplu, atunci când respirația este puternic inhibată și prin urmare foarte lentă sau dacă un anumit nămol activ respiră foarte repede. Acest demers este acceptabil cu condiția ca secțiunile extinse ale graficului de viteză să fie drepte, iar gradienții să nu se modifice atât timp cât traversează limitele de 2,0 mg/l sau 7,0 mg/l O_2. Orice secțiune curbată a graficului indică faptul că sistemul de măsurare se stabilizează sau că viteza de consum se modifică și nu ar trebui utilizate pentru calcularea vitezelor de respirație. Viteza consumului de oxigen trebuie exprimată în miligrame per litru pe oră (mg/lh) sau în miligrame per gram de nămol uscat pe oră (mg/gh). Viteza consumului de oxigen, R, în mg/lh, poate fi calculată sau interpolată plecând de la partea liniară a graficului de descreștere a cantității de oxigen în conformitate cu ecuația 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

unde:

Q_1 este concentrația de oxigen la începutul secțiunii selectate a fazei liniare (mg/l);

Q_2 este concentrația de oxigen la finalul secțiunii selectate a fazei liniare (mg/l);

Δ_t este intervalul de timp dintre aceste două măsurători (min.).

47. Viteza de respirație specifică (R_s) este exprimată ca fiind cantitatea de oxigen consumată per g de masă uscată de nămol pe oră (mg/gh) în conformitate cu ecuația 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

unde SS este concentrația de solide în suspensie din amestecul de testare (g/l).

48. Diferiții indici ai R care pot fi combinați sunt:

S viteza specifică

T viteza de respirație totală

N viteza de respirație legată de nitrificare

H viteza de respirație heterotrofă

A viteza corespunzătoare proceselor abiotice

B viteza pe baza determinărilor pe probe de control neutre (medie)

Calculul vitezei consumului de oxigen legat de nitrificare

49. Relația dintre respirația totală (R_T), respirația legată de nitrificare (R_N) și respirația heterotrofă (R_H) se obține din ecuația 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

unde:

R_N este viteza consumului de oxigen legat de nitrificare (mg/lh);

R_T este viteza măsurată a consumului de oxigen al probei de control neutre (fără ATU; F_B) (mg/lh).

R_H este viteza măsurată a consumului de oxigen al probei de control neutre cu ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Această relație este valabilă pentru valorile probelor de control neutre (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), probele de control abiotice (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) și determinările cu substanțele chimice de testare (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Vitezele de respirație specifice se calculează pornind de la:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Dacă R_N este nesemnificativă (de exemplu < 5 % din R_T a probelor de control neutre) într-un test preliminar, se poate presupune că consumul de oxigen heterotrof este egal cu consumul total și că nu se produce nitrificare. Dacă testele trebuie să țină cont de efectele asupra microorganismelor heterotrofe și nitrificante, este necesară o altă sursă de nămol activ. Dacă există dovezi ale unor viteze ale consumului de oxigen inhibate cu diferite concentrații ale substanței chimice de testare, se realizează un test final.

Calculul procentajului de inhibare

52. Procentajul de inhibare, I_T, a consumului total de oxigen la fiecare concentrație a substanței chimice de testare se obține din ecuația 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. În mod similar, procentajul de inhibare a consumului heterotrof de oxigen, I_H, la fiecare concentrație a substanței chimice de testare se obține din ecuația 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. În final, inhibarea consumului de oxigen legat de nitrificare, I_N, la fiecare concentrație se obține din ecuația 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Procentajul de inhibare a consumului de oxigen se reprezintă grafic în funcție de logaritmul concentrației substanței chimice de testare (curba inhibării, a se vedea fig. 3 din apendicele 4). Curbele inhibării se reprezintă grafic pentru fiecare perioadă de aerare de 3 ore sau de 3 ore și 30 de minute. Concentrația substanței chimice de testare care inhibă consumul de oxigen cu 50 % (EC_{50}) trebuie calculată sau interpolată din grafic. Dacă sunt disponibile date adecvate, se pot calcula sau interpola limitele de încredere de 95 % ale EC_{50}, panta curbei și valorile adecvate pentru a reprezenta începutul inhibării (de exemplu, EC_{10} sau EC_{20}) și finalul intervalului de inhibare (de exemplu, EC_{80} sau EC_{90}).

56. Trebuie avut în vedere că din cauza variabilității rezultatelor observate adesea, în multe cazuri poate fi suficientă exprimarea suplimentată a rezultatelor în ordinul de mărime, de exemplu:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} între 1 mg/l și 10 mg/l

EC_{50} între 10 mg/l și 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Interpretarea rezultatelor

EC_x

▼M6

57. Valorile EC_x, inclusiv limitele de încredere de 95 % inferioare și superioare corespunzătoare parametrului se calculează utilizând metodele statistice adecvate [de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Karber sau simpla interpolare (11)]. O valoare EC_x se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu x % din media etaloanelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC_{50} sau a unei alte valori EC_x, mediile per tratament (x) trebuie supuse unei analize de regresie.

Estimarea NOEC

58. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice adecvate conform Documentului OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application" (11). În general, efectele adverse ale substanței chimice de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la $p \leq 0{,}05$.

Raportul de testare

59. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța chimică de testare

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, puritatea;

— proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare [de exemplu, log K_{ow}, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și posibile informații privind transformarea substanței chimice de testare, de exemplu, adsorbția în nămolul activ).

Sistemul de testare

— sursa, condițiile de funcționare a stației de tratare a apelor uzate și afluenții pe care îi primește, concentrația, pretratarea și întreținerea nămolului activ.

Condițiile de testare

— temperatura de testare, pH-ul pe parcursul testului și durata fazei (fazelor) de expunere.

Rezultatele

— consumul specific de oxigen al probelor de control [mg O_2/(g nămol × h)];

— toate datele măsurate, curba (curbele) inhibării și metoda de calcul al EC_{50};

— EC_{50} și, dacă este posibil, limitele de încredere de 95 %, eventual EC_{20}, EC_{80}; eventual NOEC și metodele statistice utilizate, în cazul în care nu se poate determina EC_{50};

— rezultatele pentru inhibarea totală și, dacă este cazul, pentru inhibarea heterotrofă și legată de nitrificare;

— consumul abiotic de oxigen în proba de control fizico-chimică (dacă se utilizează);

— denumirea substanței chimice de referință și rezultatele cu această substanță chimică;

— toate observațiile și abaterile de la procedura standard care ar fi putut influența rezultatul.

BIBLIOGRAFIE

(1) Brown, D., Hitz, H.R. și Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼**M6**

(2) King, E. F. şi Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

Apendicele 1

Definiții

În cadrul prezentei metode de testare se aplică următoarele definiții.

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„ECx (concentrație efectivă pentru un efect de x %)” înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC_{50} reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite.

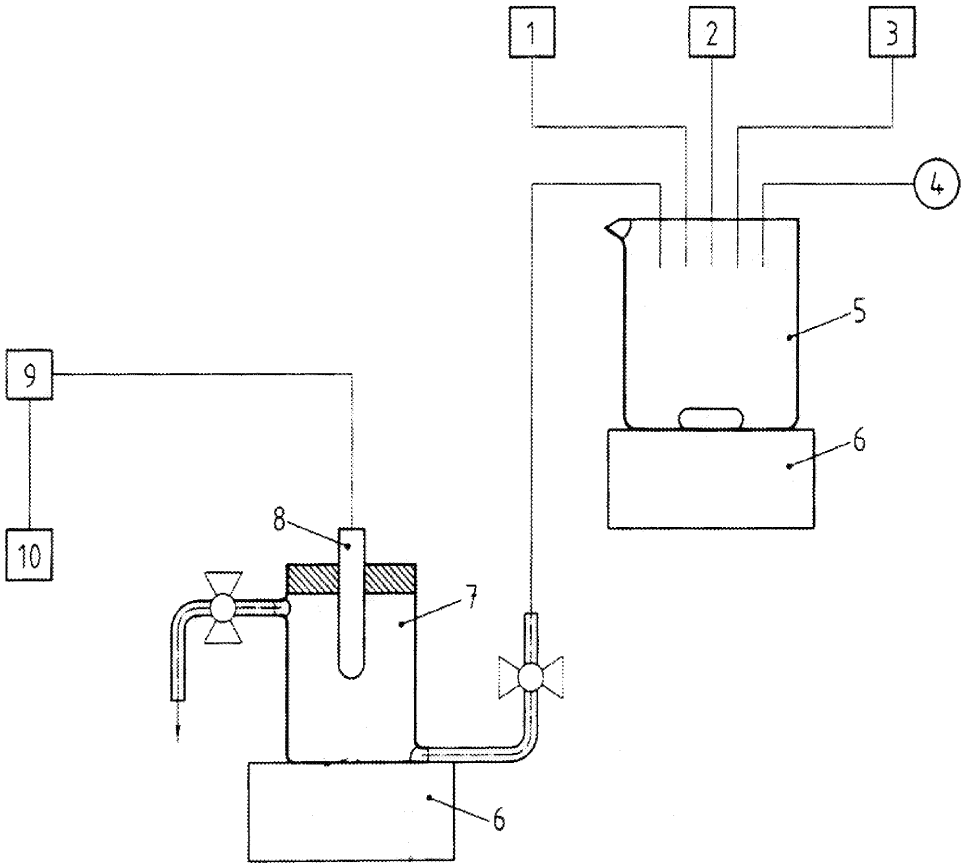
„NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect)” înseamnă concentrația substanței chimice de testare în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

▼**M6**

Apendicele 2

Fig. 1: **Exemple de unitate de măsură**



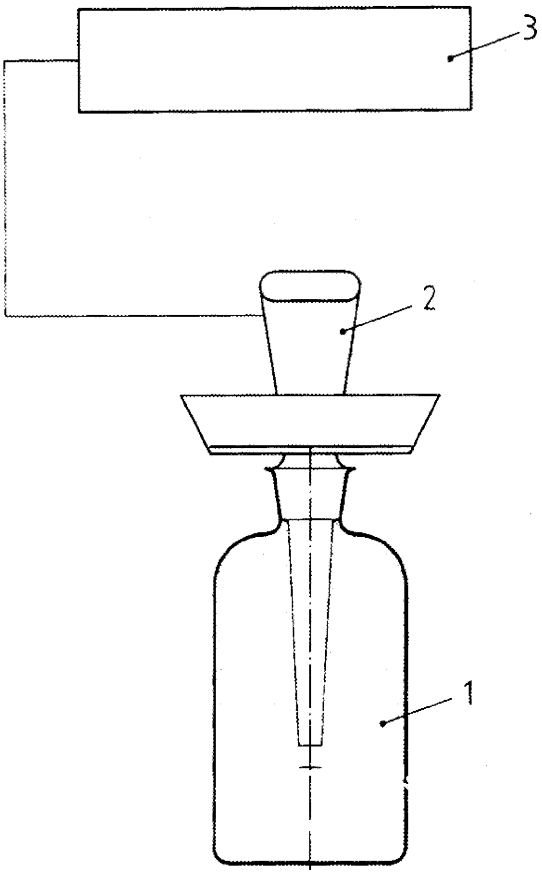
Legendă

1	nămol activ	6	agitator magnetic
2	mediu sintetic	7	celulă de măsurare a oxigenului
3	substanță chimică de testare	8	electrod de oxigen
4	aer	9	instrument de măsurare a oxigenului
5	vas de amestecare	10	înregistrator

▼**M6**

Apendicele 3

Fig. 2: **Exemplu de unitate de măsură, utilizând un vas CBO**



Legendă

1 Vas de testare

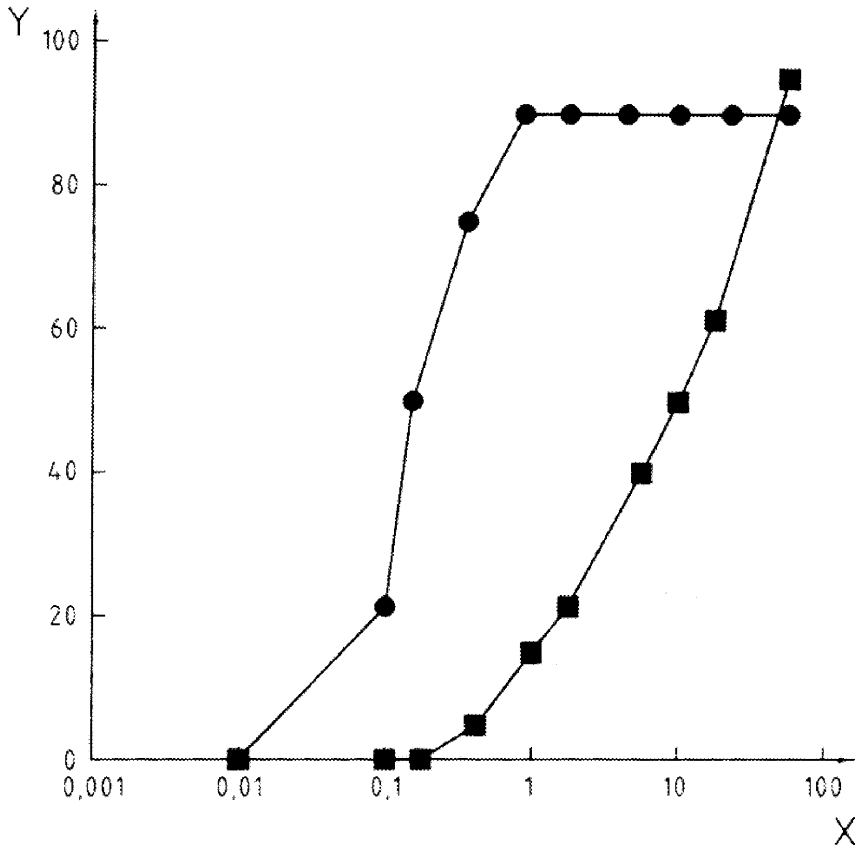
2 Electrod de oxigen

3 Instrument de măsurare a oxigenului

▼**M6**

Apendicele 4

Fig. 3: **Exemplu de curbă de inhibare**



Legendă

X concentrația 3,5-diclorfenolului (mg/l)

Y inhibarea (%)

■ respirația heterotrofă din timpul inhibării utilizând un nămol nitrificant

● nitrificarea din timpul inhibării utilizând un nămol nitrificant.

▼B

C.12. **BIODEGRADARE**

TESTUL SCAS MODIFICAT

1. **METODĂ**

1.1. INTRODUCERE

Scopul metodei este evaluarea biodegradabilității totale potențiale a substanțelor organice nevolatile și solubile în apă, când sunt expuse la concentrații relativ mari de microorganisme pe o perioadă lungă de timp. Viabilitatea microorganismelor se menține pe această perioadă prin aport zilnic de apă uzată decantată (pentru condițiile de sfârșit de săptămână, apa poate fi păstrată la 4 ^{o}C. Alternativ, se poate folosi apa uzată sintetică din testul de confirmare OCDE).

Poate avea loc adsorbția fizico-chimică pe materiile solide în suspensie, acest lucru trebuind luat în considerare la interpretarea rezultatelor (a se vedea punctul 3.2.).

Datorită perioadei de păstrare îndelungată a fazei apoase (36 de ore) și adăugării intermitente a substanțelor nutritive, testul nu simulează condițiile din mediul natural în stația de epurare a apei uzate. Rezultatele obținute cu diferite substanțe de testat arată că testul are un potențial mare de evaluare a biodegradabilității.

Condițiile prevăzute de test sunt extrem de favorabile selecției și/sau adaptării microorganismelor capabile să degradeze compusul de testare. (Procedura poate fi folosită și pentru a produce inoculi aclimatizați pentru utilizare în alte teste.)

În această metodă, măsurarea concentrației carbonului organic dizolvat se folosește pentru a evalua biodegradabilitatea totală a substanțelor de testat. Este preferabil să se determine COD după acidificare și purjare, nu ca diferență între $C_{total} - C_{anorganic}$

Utilizarea simultană a metodei analitice specifice poate permite evaluarea biodegradării primare a substanței (dispariția structurii chimice inițiale).

Metoda se aplică numai pentru substanțele organice care, la concentrația folosită în test:

— sunt solubile în apă (cel puțin 20 mg carbon organic dizolvat/litru);

— au presiunea vaporilor neglijabilă;

— nu sunt inhibitoare pentru bacterii;

— nu se adsorb semnificativ în sistemul de testare;

— nu se pierd prin spumare din soluția testată.

Trebuie stabilit conținutul de carbon organic al compusului testat.

▼B

Informațiile despre proporțiile relative ale principalelor componente ale substanței de testat se utilizează la interpretarea rezultatelor obținute, în special în cazurile în care rezultatele indică valori scăzute sau marginale.

Informațiile despre toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor se folosesc pentru interpretarea rezultatelor cu valori scăzute și pentru alegerea unor concentrații adecvate de testare.

1.2. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

C_T = concentrația substanței de testat, exprimată în carbon organic prezent sau adăugat în apa uzată decantată la începutul perioadei de aerare (mg/l);

C_t = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției testate la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l);

C_c = concentrația de carbon organic dizolvat determinată în supernatantul soluției de control la sfârșitul perioadei de aerare (mg/l).

Biodegradarea se definește în această metodă ca fiind dispariția carbonului organic. Biodegradarea poate fi exprimată ca:

1. Procentul de eliminare D_{da} al cantității de substanță adăugată zilnic:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

unde:

D_{da} = degradare/adaos zilnic.

2. Procentul de eliminare D_{ssd} a cantității de substanță prezente la începutul fiecărei zile:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

unde

D_{ssd} = degradare/substanță la începutul zilei;

indicii i și (i + 1) se referă la ziua măsurării.

Se recomandă ecuația 2(a) dacă COD al efluentului variază de la zi la zi, în timp ce ecuația 2(b) se poate folosi când COD al efluentului rămâne relativ constant de la zi la zi.

▼B

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

În unele cazuri, când se studiază o substanță nouă, pot fi utile substanțele de referință; cu toate acestea, nu se recomandă aici nicio substanță de referință specifică.

Datele despre mai mulți compuși evaluați în testele de comparație interlaboratoare (a se vedea apendicele 1) se prezintă în principal pentru a permite calibrarea periodică acestei metode și compararea rezultatelor dacă se folosește altă metodă.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Nămolul activ din instalația de tratare a apei uzate se introduce într-o instalație de tratare cu nămol activ cu alimentare semicontinuă (SCAS). Se adaugă substanța de testat și apa uzată menajeră decantată, iar amestecul se aerează 23 de ore. Aerarea este apoi oprită, nămolul se lasă să se decanteze și se elimină supernatantul.

Nămolul care rămâne în vasul de aerare se amestecă apoi cu o parte din substanța de testat și de apă uzată, iar ciclul se repetă.

Biodegradarea se evaluează prin determinarea conținutului de carbon organic dizolvat în soluția de supernatant. Valoarea obținută se compară cu cea găsită pentru soluția dintr-un tub martor alimentat numai cu apă uzată decantată.

Dacă se folosește o metodă analitică specifică, se pot măsura schimbările din concentrația moleculei inițiale care se datorează biodegradării (biodegradabilitate primară).

1.5. CRITERII DE CALITATE

Nu s-a stabilit încă reproductibilitatea prezentei metode bazate pe eliminarea carbonului organic dizolvat. (Dacă se ia în considerare biodegradarea primară, se obțin date foarte exacte pentru substanțele care sunt foarte degradate).

Sensibilitatea acestei metode este determinată în mare parte de variabilitatea probei martor și într-o mai mică măsură de precizia determinării carbonului organic dizolvat și de nivelul substanței de testat în soluție la începutul fiecărui ciclu.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. *Pregătire*

Se folosește un număr suficient de unități de aerare curate, alternativ cu unitatea originală de testare SCAS de 1,5 l și se montează tuburile de intrare a aerului (figura 1) pentru fiecare substanță testată și proba martor. Aerul comprimat care pătrunde în unitățile de testare, purificat printr-un filtru de vată hidrofilă, nu trebuie să conțină carbon organic și să fie deja saturat cu apă pentru a se reduce pierderile prin evaporare.

Se prelevează o probă de soluție mixtă ce conține 1-4 g materii solide în suspensie pe litru din stația de epurare a apei uzate cu nămol activ. Sunt necesari aproximativ 150 ml de soluție omogenă pentru fiecare instalație de aerare.

▼B

Soluțiile mamă se prepară cu apă distilată; în mod normal, concentrația necesară este de 400 mg/l exprimată în carbon organic, ceea ce dă o concentrație a substanței de testat de 20 mg/l carbon la începutul fiecărui ciclu de aerare, dacă nu se produce nicio biodegradare.

Sunt acceptabile concentrații mai mari dacă toxicitatea față de microorganisme permite acest lucru.

Se măsoară conținutul în carbon organic al soluțiilor mamă.

1.6.2. *Condiții de testare*

Testul trebuie realizat la 20-25 °C.

Se folosește o concentrație mare de microorganisme aerobe (1-4 g/l materii solide în suspensie), iar perioada de păstrare efectivă este de 36 ore. Carbonul organic din efluentul uzat este, în mod normal, oxidat puternic după 8 ore după începerea fiecărui ciclu de aerare. Apoi, nămolul respiră endogen în perioada rămasă de aerare, timp în care singurul substrat disponibil este substanța de testat, dacă aceasta nu se metabolizează ușor. Aceste caracteristici, combinate cu reinocularea zilnică a soluției de testat, dacă se folosește apă de uzată menajeră ca mediu, oferă condiții favorabile atât pentru aclimatizare, cât și pentru o biodegradare rapidă.

1.6.3. *Desfășurarea testului*

Se prelevează o probă de soluție omogenă din instalația de epurare a apei predominant menajere cu nămol activ sau dintr-o unitate de laborator și se păstrează în condiții aerobe până la folosirea în laborator. Fiecare unitate de aerare, precum și unitatea martor, se umple cu 150 ml de soluție omogenă (dacă se folosește unitatea de testare originală SCAS, volumele date se înmulțesc cu 10) și începe aerarea. După 23 de ore aerarea se oprește, iar nămolul se lasă să se decanteze timp de 45 de minute. Se deschide pe rând robinetul fiecărui recipient și se extrag 100 ml din supernatant. Se prelevează o probă de apă uzată menajeră decantată, imediat înainte de utilizare, și se adaugă 100 ml la nămolul rămas în fiecare unitate de aerare. Aerarea se pornește din nou. În această fază nu se adaugă nicio substanță de testat, iar unitățile se alimentează zilnic cu apă uzată menajeră până când la decantare se obține un supernatant limpede. De obicei, aceasta poate să dureze 2 săptămâni, timp în care carbonul organic dizolvat în supernatant, la sfârșitul fiecărui ciclu de aerare, se apropie de o valoare constantă.

La sfârșitul acestei perioade, nămolurile decantate individual se amestecă și se adaugă în fiecare unitate câte 50 ml din nămolul compozit rezultat.

În unitățile martor se adaugă 95 ml apă uzată decantată și 5 ml de apă, iar în unitățile de testare se adaugă 95 ml de apă uzată decantată și 5 ml de soluție mamă a substanței de testat corespunzătoare (400 mg/l). Aerarea începe din nou și continuă 23 de ore. Nămolul se lasă să se decanteze 45 minute, se scoate supernatantul și se analizează conținutul de carbon organic dizolvat.

Procedeul de mai sus, de umplere și scoatere, se repetă zilnic, pe toată perioada testului.

▼B

Înainte de decantare, poate fi necesară curățarea pereților unităților pentru a preveni acumularea de materii solide peste nivelul lichidului. Se folosește o racletă sau o perie pentru fiecare unitate, pentru a preveni contaminarea.

Ideal este să se determine zilnic conținutul de carbon organic dizolvat în supernatant. Înainte de analiză, soluțiile se filtrează prin filtre cu membrană de 0,45 μm, se spală sau se centrifughează. Filtrele cu membrană sunt acceptabile dacă se asigură că nu are loc nici eliminare de carbon, nici absorbție de substanță în faza de filtrare. Temperatura probei nu trebuie să depășească 40 ^{o}C când aceasta este în centrifugă.

Durata testului pentru substanțele care prezintă biodegradare scăzută sau nulă este nedeterminată, dar experiența arată că aceasta trebuie să fie de cel puțin 12 săptămâni, în general, dar nu mai mult de 26 săptămâni.

2. **DATE ȘI EVALUARE**

Valorile masei de carbon organic dizolvat în soluțiile de supernatant din unitățile de testare și din unitățile martor sunt reprezentate grafic în funcție de timp.

Pe măsură ce se realizează biodegradarea, nivelul constatat la testare se apropie de cel din proba martor. Când se constată că diferența dintre cele două niveluri este constantă la trei măsurări consecutive, se efectuează un număr suficient de măsurări suplimentare, pentru a permite interpretarea statistică a datelor și calcularea procentului de biodegradare al substanței de testat (D_{da} sau D_{ssd}, a se vedea punctul 1.2).

3. **RAPORT**

3.1. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină, dacă este posibil, următoarele informații:

— toate informațiile despre tipul de apă uzată, tipul de unități folosite și rezultatele experimentale privind substanța de testat, substanța de referință (dacă s-a folosit) și proba martor;

— temperatura;

— curba de eliminare cu descriere și mod de calcul (a se vedea punctul 1.2);

— data și locul unde au fost prelevate probele de nămol activ și apă uzată, starea adaptării, concentrația etc.;

— argumentele științifice pentru eventualele modificări ale metodei de testare;

— semnătura și data.

▼B

3.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Deoarece substanța care urmează să fie testată prin această metodă nu este ușor biodegradabilă, orice eliminare a COD datorată numai biodegradării este în mod normal treptată, în zile sau săptămâni, cu excepția cazurilor în care aclimatizarea este bruscă, așa cum indică dispariția bruscă care se petrece după câteva săptămâni.

Cu toate acestea, adsorbția fizico-chimică poate juca uneori un rol important; acesta se manifestă prin eliminarea completă sau parțială a COD-ului adăugat de la început. Ceea ce se întâmplă ulterior depinde de factori cum ar fi gradul de absorbție și concentrația materiilor solide în suspensie în efluentul eliminat. De obicei, diferența dintre concentrația COD în soluția martor și în supernatantul de testare crește treptat de la valoarea inițială redusă, această diferență rămânând apoi la noua valoare în restul experimentului, dacă nu are loc aclimatizarea.

Dacă trebuie să se facă o distincție între biodegradare (sau biodegradare parțială) și adsorbție, sunt necesare teste ulterioare. În acest scop există mai multe metode, cea mai convingătoare fiind utilizarea supernatantului sau a nămolului ca inocul într-un test din setul de bază (de preferință un test respirometric).

Substanțele de testat care dau valori mari de eliminare de COD neadsorbit în acest test trebuie considerate ca posibil biodegradabile. Eliminarea parțială neadsorbtivă arată că substanța chimică este supusă cel puțin unei degradări parțiale.

Eliminările reduse sau nule ale COD se pot datora inhibării microorganismelor de către substanța de testat și acest lucru poate fi dovedit prin liză și pierderea nămolului, rezultând supernatanți tulburi. Testul trebuie repetat folosindu-se o concentrație mai scăzută de substanță testată.

Utilizarea unei metode analitice specifice sau a unei substanțe de testat marcate cu ^{14}C permite o sensibilitate mai mare. În cazul substanței de testat cu ^{14}C, recuperarea $^{14}CO_2$ va confirma că biodegradarea s-a produs.

În cazul în care rezultatele sunt exprimate în termeni de biodegradare primară, este necesar să se dea, în măsura în care este posibil, explicații cu privire la modificarea structurii chimice care duce la pierderea răspunsului substanței de testat inițiale.

Validarea metodei analitice trebuie însoțită de rezultatul obținut în mediului testului martor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OCDE, Paris, 1981, Linii directoare privind testele 302 A, Decizia Consiliului C(81) 30 final.

▼B

Apendicele 1

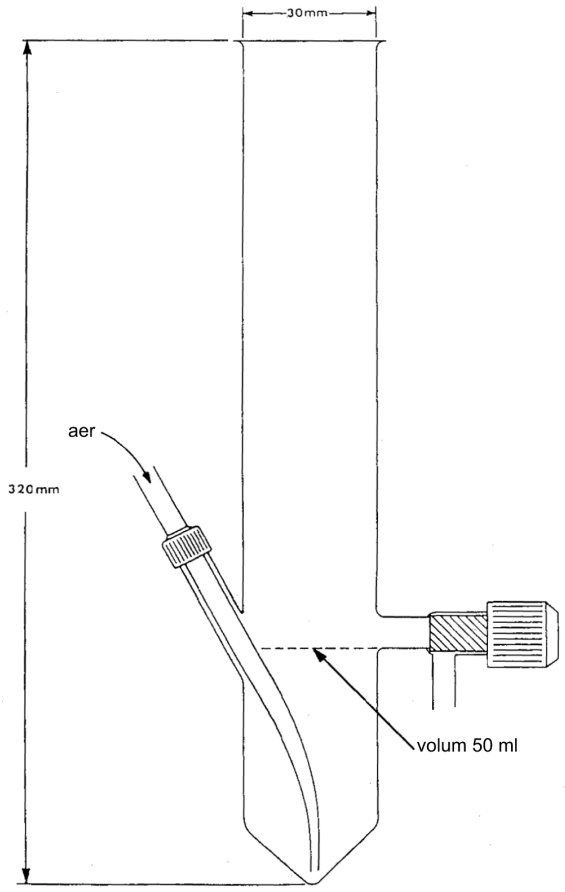
Test SCAS: Exemple de rezultate

Substanță	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Procent de biodegradare D_{da}	Durata testului (zile)
4-acetil aminobenzen sulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetra-propilen benzen sulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilină	16,9	1,7	95,9	40
Ciclopentan tetra carboxilat	16,9	3,2	81,1	120

▼B

Apendicele 2

Exemplu de aparatură de testare



▼M7

C.13. BIOACUMULAREA LA PEȘTI: EXPUNEREA PRIN APĂ ȘI PRIN ALIMENTAȚIE

INTRODUCERE

Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 305 (2012). Obiectivul major al actualei revizuiri a metodei de testare privește două aspecte. În primul rând, aceasta este destinată să includă un test de bioacumulare alimentară ([1]) adecvat pentru a determina potențialul de bioacumulare al substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă. În al doilea rând, aceasta urmărește să creeze o metodă de testare care, atunci când este cazul, utilizează mai puțini pești din motive de bunăstare a animalelor și care este mai eficientă din punct de vedere al costurilor.

În anii de după adoptarea metodei de testare consolidate C.13 (1) au fost testate numeroase substanțe și s-a acumulat o experiență considerabilă atât de către laboratoare, cât și de autoritățile de reglementare. Acest lucru a condus la convingerea că poate fi redusă complexitatea testului dacă se îndeplinesc criterii specifice (a se vedea punctul 88) și că o abordare secvențială este posibilă. Experiența a arătat, de asemenea, că factorii biologici precum rata de creștere și conținutul de lipide din pește pot avea un impact semnificativ asupra rezultatelor și ar putea fi necesară luarea lor în considerare. În plus, s-a recunoscut faptul că testarea substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă poate să nu fie fezabilă din punct de vedere tehnic. În plus, în cazul substanțelor cu solubilitate foarte scăzută în apă în mediul acvatic, expunerea prin apă poate avea o importanță limitată în comparație cu administrarea prin alimentație. Acest lucru a condus la elaborarea unei metode de testare în care peștii sunt expuși prin intermediul alimentației acestora (a se vedea punctele 7-14 și începând cu 97). În anul 2010 a fost efectuată validarea (test interlaboratoare) testului de expunere prin alimentație (51).

Principalele modificări includ:

— Testarea unei singure concentrații de testare poate fi considerată suficientă atunci când este probabil ca factorul de bioconcentrare (BCF) să fie independent de concentrația de testare.

— Un model minimizat al testului cu expunere prin apă în cadrul căruia există posibilitatea unui număr redus de puncte de eșantionare,dacă sunt îndeplinite criterii specifice.

— Se măsoară conținutul lipidic al peștelui astfel încât BCF să poată fi exprimat pe baza unui conținut lipidic al peștelui de 5 %.

— Un accent mai mare pe estimarea BCF cinetică (atunci când este posibil) pe lângă estimarea BCF în starea staționară.

— Pentru anumite grupuri de substanțe va fi propus un test de expunere prin alimentație, în cazurile în care se consideră că acest lucru este mai adecvat decât un test de expunere prin apă.

— Se măsoară greutatea peștelui astfel încât BCF_k să poată fi corectat pentru diluția de creștere.

Înainte de a efectua oricare dintre testele de bioacumulare, următoarele informații privind substanța de testat trebuie să fie cunoscute:

(a) Sensibilitatea tehnicii analitice pentru măsurarea țesutului și a concentrațiilor tisulare și în apă sau în alimentație, atât pentru substanța de testat, cât și pentru posibilii metaboliți (a se vedea punctul 65).

(b) Solubilitatea în apă [MT A.6; (2)]; aceasta se determină în conformitate cu o metodă adecvată pentru plaja de valori (estimată) a solubilității pentru a obține o valoare fiabilă. În cazul substanțelor hidrofobe, în general, aceasta va fi metoda eluției pe coloană.

([1]) A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

▼M7

(c) Coeficientul de partiție n-octanol-apă, K_{OW} ([1]) [MT A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; sau alte informații relevante cu privire la comportamentul de partiționare (de exemplu, sorbția lipidelor, K_{OC}); acesta se determină în conformitate cu o metodă adecvată pentru plaja de valori (estimată) a K_{OW} pentru a obține o valoare fiabilă. În cazul substanțelor hidrofobe, în general, aceasta va fi metoda agitării lente [MT A.23 (6)];

(d) Stabilitatea substanței în apă [hidroliză [MT C.7 (7)];

(e) Stabilitatea substanței în alimente (în special în cazul în care se alege o abordare de testare a expunerii prin alimentație);

(f) Informații cu privire la fototransformare, relevante pentru condițiile de iradiere din test (8);

(g) Tensiunea superficială (și anume, pentru substanțele la care nu se poate determina log K_{OW}) [MT A.5 (9)];

(h) Presiunea de vapori [MT A.4 (10)];

(i) Orice informații privind degradarea biotică sau abiotică în apă, precum (dar fără a se limita la) biodegradabilitatea rapidă [MT C.4 părțile de la II la VII(11), C.29 (12)], după caz;

(j) Informații cu privire la metaboliți: structura, log K_{OW}, formarea și degradabilitatea, după caz;

(k) Constanta de disociere acidă (pK_a) pentru substanțele care pot ioniza. În cazul în care este necesar, se ajustează pH-ul apei de testare pentru a se asigura că substanța este în formă neionizată în cadrul testului, dacă este compatibilă cu speciile de pești.

Independent de metoda de expunere selectată sau de schema de prelevare de probe, această metodă de testare descrie o procedură de caracterizare a potențialului de bioacumulare al substanțelor în pești. Cu toate că sunt preferate testele în regim dinamic, sunt permise regimurile semistatice, cu condiția îndeplinirii criteriilor de validitate (a se vedea punctele 24 și 113). În expunerea prin alimentație, sistemul dinamic nu este necesar pentru a menține concentrații apoase ale substanței de testat, dar contribuie la menținerea unui nivel adecvat de concentrații de oxigen dizolvat și la asigurarea apei curate și elimină influența, de exemplu, a produselor de excreție.

Independent de metoda de testare selectată, în această metodă de testare se furnizează suficiente detalii pentru efectuarea testului, permițând în același timp libertatea adecvată de a adapta modelul experimental la condițiile din laboratoare specifice și de a varia caracteristicile substanțelor de testat. Testul de expunere prin apă se aplică cel mai adecvat substanțelor organice stabile cu valori log K_{OW} între 1,5 și 6,0 (13), dar poate fi aplicat, de asemenea, substanțelor puternic hidrofobe (având log K_{OW}> 6,0), în cazul în care se poate demonstra o concentrație stabilă și pe deplin dizolvată a substanței de testat în apă. În cazul în care nu se poate demonstra o concentrație stabilă a substanței de testat în apă, un studiu pe o soluție apoasă nu ar fi adecvat, prin urmare, ar fi necesară abordarea prin alimentație pentru testarea substanței în pește (cu toate că interpretarea și utilizarea rezultatelor testului de alimentație pot depinde de cadrul de reglementare). Estimările prealabile ale factorului de bioconcentrare (BCF, uneori denumit K_B) pentru substanțele organice cu valori log K_{OW} până la aproximativ 9,0 pot fi calculate utilizând ecuația lui Bintein *et al.* (14). Estimarea prealabilă a factorului de bioconcentrare pentru astfel de substanțe foarte hidrofobe poate fi mai mare

([1]) Uneori desemnată prin P_{OW}; determinată printr-o metoda de agitare a flaconului la MT A.8 (4), o metodă HPLC în A.24 (5) și o metodă a agitării lente în MT A.23 (6). O tehnică de generare a coloanei este utilizată uneori pentru determinarea log K_{OW}. Este disponibil un număr limitat de studii care fac uz de această tehnică, în principal pentru bifenili clorurați și dibenzodioxine (de exemplu, Li and Doucette, 1993) (3). În cazul substanțelor care pot ioniza, log K_{OW} se referă la forma neionizată.

▼M7

decât valoarea factorului de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}) preconizată a fi obținută din experimente de laborator, în special când se utilizează un model liniar simplu pentru estimarea prealabilă. Parametrii care caracterizează potențialul de bioacumulare includ constanta de viteză de absorbție (k_1) constante de viteză de eliminare, inclusiv constanta de viteză de eliminare (k_2), factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}), factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_K) și factorul de bioamplificare prin alimentație (BMF) ([1]).

Substanțele de testat marcate radioactiv pot facilita analiza probelor de apă, de hrană și de pește și pot fi utilizate pentru a stabili dacă va fi necesară identificarea și cuantificarea metaboliților. În cazul în care se măsoară totalul de reziduu radioactiv singur (de exemplu, prin combustia ori solubilizarea țesuturilor), BCF sau BMF se bazează pe valoarea totală a substanței mamă, toți metaboliții reținuți și, de asemenea, pe carbonul asimilat. Valorile BCF sau BMF care se bazează pe reziduurile radioactive totale nu pot fi comparați, prin urmare, în mod direct cu un factor BCF sau BMF derivat dintr-o analiză chimică particulară exclusiv a substanței mamă. Procedurile de separare, precum TLC, HPLC sau CG ([2]) pot fi utilizate înainte de analiză în cadrul studiilor cu markeri radioactivi pentru a determina BCF sau BMF pe baza substanței mamă. Atunci când se aplică tehnici de separare, se efectuează identificarea și cuantificarea substanței mamă și a metaboliților relevanți ([3]) (a se vedea punctul 65) în cazul în care BCF sau BMF urmează să fie bazate pe concentrația substanței mamă în pești și nu pe total de reziduu marcat radioactiv. De asemenea, este posibil să se combine un metabolism al peștilor sau un studiu *in vivo* de distribuție cu un studiu de bioacumulare prin analiza și identificarea reziduurilor tisulare. Posibilitatea metabolismului poate fi prevăzută utilizând instrumente adecvate (de exemplu, OCDE, QSAR Toolbox (15) și programe QSAR care fac obiectul unui drept de proprietate).

Decizia privind efectuarea unui test de expunere prin apă sau de expunere prin alimentație și tipul de configurație se bazează pe factorii de la punctul 3, luați în considerare împreună cu cadrul de reglementare relevant. De exemplu, în cazul substanțelor care au o valoare log K_{OW} ridicată, dar care prezintă cu toate acestea o solubilitate în apă semnificativă în ceea ce privește sensibilitatea tehnicilor analitice disponibile, se ia în considerare în primă instanță un test de expunere prin apă. Cu toate acestea, este posibil ca informațiile cu privire la solubilitatea în apă să nu fie definitive pentru aceste tipuri de substanțe hidrofobe, astfel încât posibilitatea de a pregăti concentrații apoase stabile, măsurabile dizolvate (nu se permit emulsii stabile), aplicabile unui studiu de expunere prin apă, se investighează înainte de a se lua o decizie cu privire la metoda de testare care trebuie să se utilizeze (16). Nu este posibil să se furnizeze indicații exacte prescriptive în ceea ce privește metoda care trebuie utilizată, pe baza solubilității în apă și a criteriilor de limitare a coeficientului de partiție octanol-apă, având în vedere faptul că alți factori (tehnici analitice, degradare, adsorbție etc.) pot avea o influență semnificativă asupra aplicabilității metodei pentru motivele prezentate anterior. Cu toate acestea, o valoare log K_{OW} mai mare de 5 și o solubilitate în apă mai mică de aproximativ 0,01-0,1 mg/l marchează plaja de valori a substanțelor la care testarea prin expunere prin apă poate deveni din ce în ce mai dificilă.

Se iau în considerare alți factori care pot influența alegerea testului, inclusiv aparatul și potențialul de absorbție al substanței în vasele de testare, stabilitatea acesteia în soluție apoasă în comparație cu stabilitatea acesteia în hrana pentru pești (17) (18) etc.

Informații privind astfel de aspecte practice pot fi disponibile din alte studii efectuate pe apă. Informații suplimentare privind evaluarea aspectelor legate de performanța studiilor de bioacumulare sunt disponibile în referințele bibliografice [de exemplu (19)].

În cazul substanțelor pentru care solubilitatea sau menținerea concentrației în apă, precum și analiza acestor concentrații nu reprezintă restricții în calea realizării

([1]) A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

([2]) TLC: cromatografie în strat subțire; HPLC: cromatografie de înaltă peformanță; CG: cromatografie în fază gazoasă.

([3]) În anumite cadre de reglementare, analiza metaboliților poate fi obligatorie atunci când sunt îndeplinite anumite condiții (a se vedea punctul 65).

▼M7

unei metode cu expuneri prin apă, se preferă această metodă pentru determinarea potențialului de bioconcentrare al substanței. În orice caz, se verifică dacă concentrația (concentrațiile) de expunere prin apă care urmează să fie aplicată (aplicate) se încadrează în solubilitatea apoasă în mediul de testare. Se pot utiliza diferite metode pentru menținerea stabilității concentrațiilor substanței de testat dizolvate, cum ar fi utilizarea de soluții mamă sau sisteme de dozare pasive (de exemplu, metoda eluției pe coloană), atât timp cât se poate demonstra că pot fi menținute concentrațiile stabile și mediile de testare nu sunt modificate față de cele recomandate la punctul 27.

În cazul substanțelor foarte hidrofobe (log K_{OW}> 5 și solubilitate sub ~ 0,01-0,1 mg/l), testarea prin expunere prin apă poate deveni din ce în ce mai dificilă. Motivele limitărilor pot fi faptul că o concentrație apoasă nu se poate menține la un nivel considerat a fi suficient de constant (de exemplu, din cauza sorbției la sticla recipientelor de expunere sau absorbției rapide de către pește) sau faptul că acele concentrații apoase care urmează să fie aplicate sunt atât de scăzute încât se află în plaja de valori sau sub limita analitică a cuantificării ([1]). În cazul acestor substanțe foarte hidrofobe, se recomandă testul prin alimentație, cu condiția ca testul să fie în conformitate cu cadrul de reglementare relevant și cu necesitățile în materie de evaluare a riscurilor.

În cazul surfactanților, se ia în considerare dacă testul de bioacumulare prin apă este fezabil, ținând cont de proprietățile substanței; în caz contrar, studiul prin alimentație este probabil mai adecvat. Surfactanții sunt agenți care acționează la suprafață, care scad tensiunea interfacială între două lichide. Natura amfifilică a acestora (și anume, aceștia conțin atât o parte hidrofilă, cât și o parte hidrofobă) îi face să se acumuleze la interfețe precum interfața apă-aer, interfața apă-hrană și pereții din sticlă, ceea ce îngreunează determinarea concentrației apoase a acestora.

Testul prin alimentație poate să evite unele aspecte de expunere pentru amestecurile complexe cu componente cu limite de solubilitate în apă diferite prin faptul că expunerea la toate componentele amestecului este mai probabilă decât în metoda prin apă [a se vedea (20)].

Se remarcă faptul că abordarea prin alimentație produce un factor de bioamplificare prin alimentație (BMF) mai degrabă decât un factor de bioconcentrare (BCF) ([2]). Există abordări disponibile pentru a estima un factor de bioconcentrare cinetică (BCF_K) pe baza datelor generate în cadrul studiului prin alimentație (astfel cum s-a discutat în apendicele 8), dar aceste abordări se utilizează cu precauție. În general, aceste abordări presupun cinetică de ordinul întâi și sunt aplicabile numai anumitor categorii de compuși. Este puțin probabil ca astfel de abordări să poată fi aplicate surfactanților (a se vedea punctul 12).

O configurație de testare cu expunere minimă prin apă cu mai puține puncte de prelevare pentru reducerea numărului de animale și/sau resurse (a se vedea punctele începând de la 83) se aplică numai substanțelor pentru care există motive să se preconizeze faptul că absorbția și eliminarea vor urmări aproximativ cinetica de ordinul întâi (și anume, în general, substanțe organice neionizate, a se vedea punctul 88).

C.13 – I **TEST DE BIOCONCENTRARE ÎN PEȘTI CU EXPUNERE PRIN APĂ**

PRINCIPIUL TESTULUI

Testul constă în două faze: faza de expunere (absorbție) și faza de post-expunere (eliminare). În timpul fazei de absorbție, un grup de pești dintr-o singură specie se expune la substanța de testat la una sau mai multe concentrații selectate, în funcție de proprietățile substanței de testat (a se vedea punctul 49). Ulterior

([1]) În general, concentrațiile măsurate în apă în timpul fazei de absorbție trebuie să fie cu cel puțin un ordin de mărime peste limita de cuantificare, astfel încât mai mult de un timp de înjumătățire a conținutului corporal să poată fi măsurat în faza de eliminare a studiului.

([2]) A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități.

▼M7

aceştia se transferă într-un mediu care nu conține substanță de testat pentru faza de eliminare. O fază de eliminare este întotdeauna necesară, în afară de cazul în care absorbția substanței în timpul fazei de absorbție a fost nesemnificativă. Se urmărește concentrația substanței de testat în/pe pești (sau în țesuturile specificate ale acestora) pe parcursul celor două faze ale testului. În plus față de grupul expus, se menține la condiții identice, excepție făcând absența substanței de testat, un grup martor de pești, pentru a raporta posibilele efecte adverse observate la testul de bioconcentrare la un grup martor congruent și pentru obține concentrații de bază ale substanței de testat ([1]).

În testul cu expunere prin apă, faza de absorbție durează, de regulă, 28 de zile. Dacă este necesar, durata poate fi prelungită (a se vedea punctul 18) sau redusă în cazul în care se demonstrează că starea de echilibru a fost atinsă mai devreme (a se vedea apendicele 1, secțiunea Definiții și unități). Utilizând ecuațiile din apendicele 5 se poate efectua o estimare a duratei fazei de absorbție și a timpului necesar pentru obținerea stării staționare. Ulterior se începe perioada de eliminare, când peștii nu mai sunt expuși la substanța de testat, cu transferarea peștilor în același mediu, dar fără substanța de testat, într-un vas curat. Acolo unde este posibil, se calculează factorul de bioconcentrare, de preferință atât ca raportul concentrației în pește (C_f), cât și în apă (C_w) în starea staționară (BCF_{SS}; a se vedea apendicele 1, secțiunea Definiții și unitați), care este estimat ca raportul dintre constanta de viteză de absorbție (k_1) și de eliminare (k_2), presupunând o cinetică de ordinul întâi ([2]).

În cazul în care nu se atinge o stare staționară în 28 de zile, fie se calculează BCF cu ajutorul abordării cinetice (a se vedea punctul 38), fie se poate prelungi faza de absorbție. În cazul în care acest lucru conduce la o fază de absorbție impractic de lungă pentru a atinge starea staționară (a se vedea punctele 37 și 38, apendicele 5), se preferă abordarea cinetică. În mod alternativ, în cazul substanțelor puternic hidrofobe se ia în considerare efectuarea unui studiu prin alimentație ([3]), cu condiția ca testul cu expunere prin alimentație să fie în concordanță cu cadrul de reglementare relevant.

Se calculează constanta de viteză de absorbție, constanta de viteză de eliminare (pierdere) (sau constantele, atunci când sunt implicate mai multe modele complexe), factorul de bioconcentrare (stare staționară și/sau cinetică) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri pornind de la modelul care descrie cel mai bine concentrațiile măsurate ale substanței de testat în pești și în apă (a se vedea apendicele 5).

Creșterea masei peștelui în timpul testului va conduce la o scădere a concentrației substanței de testat din peștii care cresc (așa-numita diluție a creșterii) și, prin urmare, BCF cinetică va fi subestimat dacă nu este corectat pentru a lua în considerare creșterea (a se vedea punctele 72 și 73).

BCF se bazează pe concentrația totală în pești (și anume, în funcție de greutatea totală umedă a peștilor). Cu toate acestea, pentru anumite scopuri, pot fi utilizate țesuturi sau organe specifice (de exemplu, mușchi, ficat) în cazul în care peștii sunt suficient de mari sau dacă aceștia pot fi separați în părți comestibile (fileuri) și necomestibile (viscere). Având în vedere faptul că, pentru numeroase substanțe organice, există o relație clară care leagă potențialul de bioconcentrare și caracterul hidrofob, va exista și o relație corespunzătoare între conținutul lipidic la peștii de testat și bioconcentrațiile observate pentru aceste substanțe.

([1]) Pentru majoritatea substanțelor de testat, în mod ideal nu trebuie să existe nicio detecție în apa martor. Concentrațiile de bază trebuie să fie relevante numai pentru materialele naturale (de exemplu, unele metale) și substanțele care sunt omniprezente în mediul înconjurător.

([2]) În cazul în care cinetica de ordinul întâi nu este respectată în mod evident, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din *apendicele 5* și se cere opinia unui biostatistician).

([3]) Absorbția poate fi limitată de concentrații de expunere scăzută, din cauza solubilității scăzute în apă la testul de bioconcentrare, în timp ce concentrații de expunere mult mai ridicată pot fi atinse cu ajutorul testului prin alimentație.

▼M7

Prin urmare, pentru a elimina această variabilă din rezultatele testelor cu substanțe foarte lipofile (și anume, cu log K_{OW} > 3), bioconcentrarea se exprimă ca normalizată la un pește cu un conținut lipidic de 5 % (pe baza greutății corporale totale umede), în plus față de cea rezultată în mod direct din studiu. Acest lucru este necesar pentru a oferi o bază din care rezultatele pentru diferite substanțe și/sau specii de testat pot fi comparate între ele. Cifra de 5 % conținut lipidic a fost utilizată pe scară largă deoarece aceasta reprezintă media conținutului lipidic al peștelui utilizat în mod obișnuit în cadrul acestei metode de testare (21).

INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

În plus față de proprietățile substanței de testare prezentate în secțiunea Introducere (punctul 3), alte informații necesare sunt toxicitatea speciilor de pești care urmează să fie utilizate în cadrul testului, de preferință CL_{50} asimptotică (și anume, independentă de timp) și/sau toxicitatea estimată din teste pe pește estimate pe termen lung [de exemplu, MT C.47(22), C.15 (23), C.14 (24)].

Se utilizează o metodă adecvată, cu exactitatea, precizia și sensibilitatea cunoscute pentru a cuantifica substanța în soluțiile de testare și în materialul biologic, precum și informații precise legate de prepararea și păstrarea probelor. Trebuie să se cunoască, de asemenea, limita de cuantificare analitică a substanței de testat, atât în apă, cât și în țesuturile peștilor. Atunci când se utilizează o substanță de testat marcată radioactiv, aceasta trebuie să aibă cea mai mare puritate posibilă (de exemplu, de preferință, > 98 %) și trebuie să se cunoască procentajul de radioactivitate asociată impurităților.

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, se aplică următoarele condiții:

Variația de temperatură a apei este mai mică de ± 2 °C, deoarece variațiile mari pot afecta parametrii biologici relevanți pentru absorbție și eliminare și pot cauza stres pentru animale.

Concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din nivelul de saturație;

Concentrația substanței de testat în vase este menținută la ± 20 % din media valorilor măsurate în timpul fazei de absorbție;

Concentrația substanței de testat este mai mică decât limita acesteia de solubilitate în apă, ținând cont de efectul pe care apa de testare îl poate avea asupra solubilității eficiente ([1]);

Mortalitatea sau alte efecte adverse/maladii înregistrate atât la peștii martor, cât și la cei tratați este mai mică de 10 % la sfârșitul testului; atunci când testul se prelungește pe mai multe săptămâni sau luni, mortalitatea sau alte efecte adverse apărute la cele două grupe de pești trebuie să fie mai mică de 5 % pe lună și să nu depășească 30 % în total. Diferențele semnificative în ceea ce privește creșterea medie între grupul de testare și cel martor de pești de la care au fost prelevate eșantioane ar putea fi o indicație a unui efect toxic al substanței de testat.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Utilizarea de substanțe de referință cu un potențial de bioconcentrare cunoscut și metabolism scăzut ar putea fi utilă pentru verificarea procedurii experimentale, dacă este necesar (de exemplu, în cazul în care un laborator nu are experiență anterioară în ceea ce privește testul sau condițiile experimentale au fost modificate).

([1]) În cazul substanțelor multicomponente, UVCB și al amestecurilor, se ia în considerare solubilitatea în apă pentru fiecare componentă relevantă pentru a determina concentrațiile de expunere adecvate.

▼M7

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Se acordă atenție deosebită la evitarea utilizării materialelor – pentru toate componentele echipamentelor – care pot dizolva, absoarbe sau leviga și care pot avea un efect advers asupra peștilor. Se pot utiliza bazine standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material chimic inert și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare (a se vedea punctul 43). Se reduce la minimum utilizarea de țevi din plastic flexibil. Se utilizează politetrafluoretilena, oțelul inoxidabil și/sau sticla. Experiențele au dovedit că, pentru substanțele cu coeficient mare de adsorbție precum piretrinele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În astfel de cazuri, echipamentul se aruncă după utilizare. Este de preferat să se expună sistemele de testare la concentrații ale substanței de testat care urmează să fie utilizate în cadrul studiului atât timp cât este necesar pentru a demonstra menținerea de concentrații de expunere stabile înainte de introducerea organismelor de testat.

Apă

În general, se utilizează apă naturală, obținută dintr-o sursă nepoluată și de calitate uniformă. Cu toate acestea, apa reconstituită (și anume, apă demineralizată cu anumite substanțe nutritive adăugate în cantități cunoscute) poate fi mai adecvată pentru a garanta o calitate uniformă în timp. Apă de diluție, care este apa care se amestecă cu substanța de testat înainte de a fi introdusă în vasul de testare (a se vedea punctul 30), trebuie să fie de o calitate care să permită supraviețuirea speciei de pești selectată, în perioada de aclimatizare și în cursul testului, fără ca aceștia să prezinte vreun aspect sau comportament anormal. În mod ideal, se demonstrează faptul că speciile supuse testului pot supraviețui, crește și reproduce în apa de diluție (de exemplu, în cultură de laborator sau printr-un test de toxicitate asupra unui ciclu biologic). Apa de diluție se caracterizează cel puțin prin pH, duritate, materii solide totale, carbon organic total (COT ()) și, de preferință, de asemenea, prin conținutul de amoniu, nitrați și alcalinitate, iar pentru speciile marine, prin salinitate. Parametrii optimi pentru pești nu sunt pe deplin cunoscuți, dar apendicele 2 indică concentrațiile maxime recomandate în legătură cu un anumit număr de parametri pentru apele proaspete și marine utilizate la testare.

Apa de diluție trebuie să fie de calitate constantă în timpul perioadei de testare. Valoarea pH-ului trebuie să fie cuprinsă între valorile 6,0-8,5 la începutul testului, dar pe durata unui test dat aceasta trebuie să se încadreze în interiorul unei plaje de ± 0,5 unități de pH. Pentru a asigura faptul că apa de diluție nu influențează în mod excesiv rezultatele testului (de exemplu, prin complexarea substanței de testat) sau că nu afectează în mod negativ performanțele stocului de pești, se prelevează în mod regulat probe pentru analiză, cel puțin la începutul și la sfârșitul testului. Determinarea conținutului de metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), a anionilor și cationilor principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, and SO_4^{2-}), a pesticidelor (de exemplu, pesticidele organofosforice totale și cele organoclorurate totale), a carbonului organic total și a solidelor în suspensie se efectuează, de exemplu, la fiecare trei luni, în cazul în care apa de diluție este cunoscută a fi relativ constantă în ceea ce privește calitatea. În cazul în care s-a demonstrat calitatea constantă a apei de diluție pe o perioadă de cel puțin un an, determinările pot fi mai puțin frecvente și intervalele se pot prelungi (de exemplu, la fiecare șase luni).

Conținutul de particule naturale, precum și de carbon organic total din apa de diluție trebuie să fie cât mai mic posibil, pentru a evita adsorbția substanței de testat în materiile organice, ceea ce i-ar putea reduce biodisponibilitatea și, prin urmare, conduce la o subestimare a BCF. Valoarea maximă admisă este de 5 mg/l pentru particulele de materie (materia uscată, care nu trece printr-un filtru de 0,45 μm) și de 2 mg/l pentru carbonul organic total (a se vedea apendicele 2). Dacă este necesar, se filtrează apa de diluție înainte de utilizare. Se

() Carbon organic total (COT) include carbon organic din particule și carbon organic dizolvat, COT = COP+ COD.

▼M7

menține la un nivel cât mai scăzut posibil contribuția la conținutul de carbon organic din apa de testat de la peștii testați (excreții) și din reziduurile alimentare (a se vedea punctul 46).

Soluții de testat

Se prepară o soluție stoc de substanță de testat la o concentrație adecvată. De preferință, soluția stoc se prepară prin simplă amestecare ori agitare a substanței de testat în apa de diluție. O alternativă care poate fi în unele cazuri adecvată este utilizarea unui sistem de dozare de desorbție în fază solidă. Nu se recomandă utilizarea solvenților sau a dispersanților (agenți de dizolvare) [a se vedea (25)]; cu toate acestea, utilizarea acestor materiale poate fi acceptabilă pentru a obține o soluție stoc de concentrația adecvată, dar se efectuează orice efort pentru a reduce la minimum utilizarea unor astfel de materiale și nu se depășește concentrația critică a micelelor acestora (dacă este cazul). Solvenții care se pot utiliza sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul; dispersanții care au fost utilizați sunt Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația solventului în mediul de testare final trebuie să fie aceeași în toate tratamentele (și anume, indiferent de concentrația substanței de testat) și nu trebuie să depășească pragurile de toxicitate corespunzătoare determinate pentru solvent în condițiile de testare. Nivelul maxim este o concentrație de 100 mg/l (sau 0,1 ml/l). Este puțin probabil că o concentrație a solventului de 100 mg/l va modifica în mod semnificativ concentrația maximă dizolvată a substanței de testat care poate fi obținută în mediu (25). Contribuția solventului (împreună cu substanța de testat) la conținutul total de carbon organic din apa de testare trebuie să fie cunoscută. Pe parcursul testului, concentrația de carbon organic total în vasele de testare nu trebuie să depășească concentrația de carbon organic provenit din substanța de testat și solventul sau agentul de solubilizare ([1]), dacă se utilizează, cu mai mult de 10 mg/l (± 20 %). Conținutul de materie organică poate avea un efect semnificativ asupra cantității de substanță de testat dizolvată în mod liber în timpul experiențelor cu reînnoire continuă asupra peștilor, în special pentru substanțele puternic lipofile. Microextracția în fază solidă (a se vedea punctul 60) poate furniza informații importante cu privire la raportul dintre compușii legați și cei dizolvați în mod liber, dintre care se presupune că cei din urmă reprezintă partea biodisponibilă. Concentrația substanței de testat trebuie să fie sub limita de solubilitate a substanței de testat în mediile de testare în pofida utilizării unui solvent sau un agent de dizolvare. Se acordă atenție deosebită la utilizarea solvenților cu biodegradabilitate rapidă având în vedere faptul că aceștia pot cauza probleme privind creșterea bacteriană în testelor cu reînnoire continuă. În cazul în care nu este posibil să se prepare o soluție stoc fără utilizarea unui agent de solubilizare, se ia în considerare gradul de adecvare al unui studiu de expunere prin apă, spre deosebire de un studiu de expunere prin alimentație.

În cazul testelor cu reînnoire continuă, este necesară utilizarea de aparatură care să disperseze și să dilueze în permanență o soluție stoc de substanță de testat (cum ar fi pompe dozatoare, diluator proporțional, sistem saturator) sau un sistem de dozare de desorbție în fază solidă pentru a aduce concentrațiilor de testare în camere. De preferință, se permit cel puțin cinci volume de înlocuitor pe zi, pentru fiecare cameră de testare. De preferință, se utilizează o metodă cu reînnoire continuă, însă în cazul în care aplicarea acesteia nu este posibilă (de exemplu, atunci când organismele din cadrul testului suferă efecte adverse), se poate utiliza o tehnică semistatică, în cazul în care se îndeplinesc criteriile de validare (a se vedea punctul 24). Se verifică debitul soluțiilor stoc și al apei de diluție, atât cu 48 de ore înainte, cât și în cursul testului, cel puțin zilnic. Se include în această verificare determinarea debitului în fiecare cameră de testare și se asigură faptul că acesta nu variază cu mai mult de 20 % atât în fiecare, cât și între acestea.

([1]) Cu toate că nu se recomandă în general, în cazul în care se utilizează un solvent sau un agent dizolvare, se adaugă carbonul organic provenit din acest agent la carbonul organic din substanța de testat pentru a se evalua concentrația de carbon organic din vasele de testare.

▼M7

Selecția speciilor

Printre criteriile importante de alegere a speciilor figurează cele privind ușurința procurării, dimensiunea și posibilitatea întreținerii ușoare în laborator. Alte criterii pentru selectarea speciilor de pești includ importanța în materie de agrement, comerț, ecologie, precum și sensibilitatea comparabilă, utilizarea cu succes în trecut etc. În apendicele 3 sunt prezentate specii de testare recomandate. Se pot utiliza alte specii, dar procedura de testare ar putea necesita adaptare pentru a furniza condiții de testare adecvate. Într-un asemenea caz, se expune justificarea alegerii speciilor și a metodei experimentale utilizate. În general, utilizarea unor specii de pești mai mici va scurta timpul până la starea staționară, dar ar putea fi necesari mai mulți pești (eșantioane) pentru a analiza în mod adecvat conținutul lipidic și concentrațiile de substanță de testat din pești. În plus, este posibil ca diferențele în ceea ce privește frecvența respiratorie și metabolismul între peștii tineri și cei mai în vârstă să poată împiedica realizarea de comparații între rezultatele obținute din diferite teste și specii de testare. Se remarcă faptul că speciile de pești testate în timpul unei etape de viață (juvenilă) cu creștere rapidă pot complica interpretarea datelor.

Păstrarea peștilor (relevantă pentru expunerea prin apă și prin alimentație)

Se aclimatizează populația de pești timp de cel puțin două săptămâni, în apă (a se vedea punctul 28) la temperatura de testare, cu furnizarea de hrană suficientă (a se vedea punctul 45). Atât apa, cât și hrana trebuie să fie de același tip cu cele utilizate în timpul testului.

După o perioadă de instalare de 48 de ore, se înregistrează rata mortalității și se aplică următoarele criterii:

— Mortalitate mai mare de 10 % din populație, în șapte zile: se renunță la întregul lot;

— Mortalitate cuprinsă între 5 și 10 % din populație, în șapte zile: se prelungește perioada de aclimatizare cu șapte zile – în cazul în care mortalitatea este mai mare de 5 % în timpul celei de a doua perioade de șapte zile, se renunță la întregul lot;

— Mortalitate mai mică de 5 % din populație, în șapte zile: se acceptă lotul.

Peștii utilizați pentru teste nu trebuie să prezinte maladii și nici anomalii observabile. Se elimină toți peștii bolnavi. Peștii nu trebuie să primească tratament pentru boală în cele două săptămâni anterioare testului sau în timpul testului.

DESFĂȘURAREA TESTULUI

Test preliminar

Se poate dovedi utilă o experimentare preliminară, pentru optimizarea condițiilor de execuție ale experimentului real, în ceea ce privește, de exemplu, selecția concentrațiilor substanței de testat, duratele fazelor de absorbție și de eliminare sau pentru a determina dacă este necesară efectuarea unui test complet. Conceperea testului preliminar trebui să fie de asemenea natură încât să se obțină informațiile necesare. Se poate lua în considerare dacă un test limită poate fi suficient pentru a obține un BCF sau dacă este necesar un studiu complet (a se vedea punctele 83-95 privind testul minimizat).

Condiții de expunere

Durata fazei de absorbție

Se poate estima durata fazei de absorbție, cu ajutorul unei experimentări preliminare (de exemplu, pornind de la un studiu anterior sau de la un studiu de acumulare pe o substanță înrudită structural) sau pornind de la anumite relații empirice, bazate pe ceea ce se cunoaște despre solubilitatea în apă ori utilizând coeficientul de partiție octanol/apă al substanței de testat (cu condiția ca absorbția să urmeze cinetica de ordinul întâi, a se vedea apendicele 5).

▼M7

Faza de absorbție va dura 28 de zile, exceptând cazul în care se poate demonstra că a fost atins un echilibru mai devreme (a se vedea apendicele 1, secțiunea definiții și unități). Se ajunge la o stare staționară în reprezentarea grafică a substanței de testat în pești (C_p) în funcție de timp, atunci când curba devine paralelă cu axa timpului și trei analize succesive ale *C*p efectuate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se încadrează în limita de ± 20 % și nu există nicio creștere semnificativă a C_p în timp între prima și ultima analiză succesivă. Atunci când se analizează probe reunite, se efectuează minim patru analize succesive. În cazul în care substanțele experimentale au caracteristici de absorbție lente, este preferabil să se opteze pentru intervale săptămânale. În cazul în care nu s-a ajuns la starea staționară în decurs de 28 de zile, fie se calculează BCF utilizând numai abordarea cinetică, abordare care nu este dependentă de atingerea stării staționare, sau se poate prelungi faza de absorbție, efectuându-se alte măsurători până la obținerea stării staționare sau timp de 60 de zile, optându-se pentru alternativa cea mai scurtă. De asemenea, concentrația substanței de testat în pești la finalul fazei de absorbție trebuie să fie suficient de mare pentru a se asigura o estimare fiabilă a k_2 din faza de eliminare. În cazul în care nicio absorbție semnificativă nu este prezentă după 28 zile, testul poate fi oprit.

Durata fazei de eliminare

Pentru substanțele care urmează cinetica de ordinul întâi, în general, jumătate din durata fazei de absorbție este suficientă pentru a se produce o reducere convenabilă (de exemplu, 95 %) a conținutului corporal de substanță de testat (a se vedea explicațiile privind estimarea, în apendicele 5). În cazul în care timpul necesar pentru realizarea unei pierderi de 95 % este prea lung, depășind, de exemplu, de două ori durata fazei de absorbție (și anume, mai mult de 56 de zile), se poate opta pentru o perioadă mai scurtă (de exemplu, până când concentrația substanței de testat devine mai mică cu 10 % din concentrația la starea staționară). Cu toate acestea, pot fi necesare perioade de eliminare mai lungi pentru substanțele cu scheme de absorbție și eliminare mai complexe decât modelul peștilor în compartiment unic, după o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care se observă și/sau anticipează astfel de modele complexe, se recomandă solicitarea de consultanță din partea unui biostatistician și/sau specialist în farmacocinetică pentru a se asigura o configurație de testare adecvată. Pe măsură ce perioada de eliminare se prelungește, numărul de pești pentru prelevare poate deveni o limitare și diferențele de creștere dintre pești pot influența rezultatele. Perioada va fi controlată, de asemenea, prin intermediul perioadei în care concentrația substanței de testat din pești se situează deasupra limitei analitice de cuantificare.

Numărul de pești pentru experiment

Alegerea numărului de pești pentru concentrația de testare se face astfel încât să fie disponibili cel puțin patru pești pentru fiecare eșantion, la fiecare punct de prelevare. Peștii se reunesc numai în cazul în care analiza exemplarelor individuale nu este fezabilă. În cazul în care se intenționează o mai mare precizie în interpolare (și parametrii derivați) sau în cazul în care sunt necesare studii asupra metabolismului (de exemplu, pentru a distinge între metaboliți și substanța mamă atunci când se utilizează substanțe de testat marcate radioactiv) vor fi necesari mai mulți pești pentru fiecare punct de prelevare. Se determină conținutul lipidic utilizând același material biologic care se utilizează la determinarea concentrației substanței de testat. În cazul în care acest lucru nu este realizabil, ar putea fi necesari pești suplimentari (a se vedea punctele 56 și 57).

În cazul în care se utilizează pești adulți (și anume, maturi din punct de vedere sexual), aceștia nu trebuie să fie într-o stare de reproducere sau reproduși recent (și anume, deja au depus icrele), fie înaintea sau în timpul testului. Se raportează, de asemenea, dacă în cadrul experimentului se utilizează masculi sau femele sau ambele sexe. În cazul în care se utilizează ambele sexe, înainte de expunere se verifică ca diferențele în ceea ce privește creșterea și conținutul lipidic să fie nesemnificative, în special în cazul în care se anticipează că va fi necesară utilizarea de loturi comune de masculi și femele cu scopul de a asigura concentrații de substanță și/sau conținut lipidic detectabile.

▼M7

În cadrul oricărui test, se selectează pești de greutate asemănătoare, astfel încât cei mai mici nu vor fi mai mici de două treimi din greutatea peștilor celor mai mari. Toți vor aparține aceleiași clase de vârstă și vor proveni din aceeași sursă. Având în vedere faptul că greutatea și vârsta unui pește pot avea un efect semnificativ asupra valorilor BCF (12), aceste informații se înregistrează cu acuratețe. Este indicat ca un subeșantion din populația de pești să fie cântărit cu puțin timp înainte de începerea testului, pentru a estima greutatea medie (a se vedea punctul 61).

Încărcarea

Se utilizează raporturi ridicate de apă/pește în scopul de a minimiza scăderea concentrației substanței de testat în apă datorită adăugării peștilor la începutul testului și, de asemenea, pentru a evita diminuarea concentrației în oxigen dizolvat. Este important ca regimul de încărcare să fie adaptat speciei utilizate pentru testare. În orice caz, în mod normal se recomandă un regim de încărcare de 0,1-1,0 g de pește (greutate umedă) la litru de apă pe zi. Se pot utiliza regimuri de încărcare mai mari în cazul în care se demonstrează că se poate menține concentrația necesară de substanță de testat în limitele de ± 20 % și concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din nivelul de saturare (a se vedea punctul 24).

La alegerea regimului de încărcare se ține cont de habitatul normal al speciilor de pești. De exemplu, peștii bentonici pot necesita un acvariu cu suprafața fundului mai mare, în comparație cu același volum de apă pentru speciile pelagice.

Alimentația

Pe parcursul perioadelor de aclimatizare și de testare, peștii se hrănesc după un regim adecvat, cu un conținut cunoscut în lipide și proteine totale, într-o cantitate suficientă pentru a-i menține în stare bună de sănătate și pentru a menține greutatea corporală (într-o oarecare măsură, creșterea este permisă). Peștii se hrănesc zilnic în perioadele de aclimatizare și de testare, la un nivel prestabilit în funcție de speciile utilizate, condițiile experimentale și valorile calorice ale produsului alimentar (de exemplu, în cazul păstrăvului-curcubeu, între aproximativ 1-2 % din greutatea corporală pe zi). Rata alimentară se selectează astfel încât să se evite creșterea rapidă și mărirea considerabilă a conținutului lipidic. Pentru a menține aceeași rată de alimentare, se recalculează în mod corespunzător cantitatea de hrană, de exemplu, o dată pe săptămână. Pentru acest calcul, greutatea peștilor din fiecare cameră de testare se va estima pornind de la greutatea peștilor eșantionați cel mai recent din respectiva cameră. Nu se cântăresc peștii rămași în cameră.

Hrana neconsumată și excrementele se sifonează zilnic din camerele de testare, la puțin timp după alimentare (de la 30 minute la o oră). Camerele se mențin cât mai curate posibil, în cursul întregului experiment, astfel încât concentrația de materie organică să fie cât mai mică (a se vedea punctul 29) având în vedere faptul că prezența carbonului organic poate limita biodisponibilitatea substanței de testat (12).

Având în vedere faptul că numeroase alimente sunt derivate din făină de pește, se garantează faptul că hrana nu va influența rezultatele testului și nu va induce efecte adverse, de exemplu, prin conținutul (urme) de pesticide, metale grele și/sau substanța de testat în sine.

Iluminare și temperatură

Se recomandă o fotoperioadă de la 12 la 16 ore, la temperatura (± 2 °C) corespunzătoare speciei utilizate (a se vedea apendicele 3). Tipul și caracteristicile iluminării vor fi clar definite. Se va ține cont de eventualele fototransformări ale substanței de testat, în condițiile de iradiere ale studiului. Se utilizează iluminare adecvată pentru a se evita expunerea peștilor la fotoproduse nenaturale. În unele cazuri poate fi esențială utilizarea de filtre pentru blocarea radiației UV mai mici de 290 nm.

▼M7

Concentrațiile de testare

Testul a fost conceput inițial pentru substanțe organice nepolare. Pentru acest tip de substanțe, expunerea peștilor la o singură concentrație se consideră a fi suficientă, având în vedere faptul că nu se preconizează efecte ale concentrației, cu toate că pot fi necesare două concentrații pentru cadrul de reglementare relevant. În cazul în care se testează substanțe din afara acestui domeniu sau se cunosc alte indicații privind posibilitatea dependenței de concentrație, testul se efectuează cu două sau mai multe concentrații. În cazul în care se testează o singură concentrație, se furnizează justificarea pentru utilizarea unei singure concentrații (a se vedea punctul 79).De asemenea, concentrația testată trebuie să fie cât mai scăzută posibil din punct de vedere tehnic sau practic (și anume, să nu fie apropiată de limita de solubilitate).

În unele cazuri, se poate anticipa faptul că bioconcentrarea substanței depinde de concentrația apei (de exemplu, în cazul metalelor, unde absorbția în pește pot fi reglementată, cel puțin parțial). Într-un astfel de caz, este necesară testarea a cel puțin două concentrații, dar de preferință mai multe (a se vedea punctul 49) care sunt relevante din punct de vedere al mediului. De asemenea, în cazul substanțelor la care concentrațiile de testat trebuie să fie aproape de limita de solubilitate, din motive practice, se recomandă testarea a cel puțin două concentrații, deoarece acest lucru poate furniza o imagine de ansamblu asupra fiabilității concentrațiilor de expunere. Alegerea concentrațiilor de testare trebuie să includă concentrația realistă din punct de vedere al mediului, precum și concentrația relevantă pentru scopul evaluării specifice.

Concentrația (concentrațiile) substanței de testat se selectează pentru a fi sub nivelul acesteia (acestora) de efect cronic sau 1 % din CL_{50} acută asimptotică, într-o plajă de valori relevantă din punct de vedere al mediului și cu cel puțin un ordin de mărime mai mare decât limita de cuantificare în apă, prin metoda analitică utilizată. Cea mai mare concentrație de testare admisă poate fi determinată, de asemenea, împărțind CL_{50} la 96 de ore printr-un raport procentual acut/cronic (de exemplu, rapoartele procentuale adecvate pentru anumite substanțe sunt aproximativ 3, dar câteva sunt peste 100).În cazul în care se utilizează o a doua concentrație, aceasta trebuie să difere de cea superioară printr-un factor de zece. În cazul în care acest lucru nu este posibil din cauza criteriului de toxicitate (care limitează concentrația maximă de substanță de testat) și a limitei analitice (care limitează concentrația minimă de substanță de testat), se poate utiliza un factor inferior celui de zece și se ia în considerare utilizarea de substanță de testat marcată radioactiv (de cea mai mare puritate posibilă, de exemplu, de preferință, > 98 %). Se acordă atenție deosebită ca niciuna dintre concentrațiile utilizate să nu depășească limita de solubilitate a substanței de testat în mediile de testare.

Martori

Apa de diluție martor sau, dacă este necesar (a se vedea punctele 30 și 31), un martor conținând agentul de dizolvare se testează în plus față de seria de teste.

Frecvența de măsurare a calității apei

În timpul testului, se măsoară oxigenul dizolvat, COT, pH-ul și temperatura în toate vasele de testare și martor. Duritatea totală și salinitatea (dacă are relevantă) se măsoară la martor (martori) și într-un vas. În cazul în care se testează două sau mai multe concentrații, se măsoară acești parametri la concentrația mai mare (sau ce mai mare). Se măsoară oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) de cel puțin trei ori – la începutul, mijlocul și sfârșitul perioadei de absorbție – și cel puțin o dată pe săptămână, în perioada de eliminare. Se măsoară COT la începutul testului (24 și 48 de ore înainte de inițierea fazei de absorbție), înainte de adăugarea peștilor și cel puțin o dată pe săptămână, în perioadele de absorbție și de eliminare. Temperatura se măsoară și se înregistrează zilnic, pH-ul la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade, iar duritatea o dată pentru fiecare test. De preferință, temperatura se supraveghează în mod continuu, cel puțin într-unul dintre vase.

▼M7

Eșantionarea și analiza peștilor și a apei

Programarea eșantionării peștilor și a apei

Se eșantionează apa din camerele de testare pentru determinarea concentrației substanței de testat înainte de adăugarea peștilor și în cursul fazelor de absorbție și de eliminare. Apa se eșantionează înainte de hrănire, concomitent cu eșantionarea peștilor. Pot fi utile eșantionări mai frecvente pentru a asigura stabilitatea concentrațiilor după introducerea peștelui. În timpul fazei de absorbție, se determină concentrațiile de substanță de testat pentru a verifica dacă acestea satisfac criteriile de validitate (punctul 24).În cazul în care analizele probelor de apă la începutul fazei de eliminare arată că substanța de testat nu este detectată, acest lucru poate fi utilizat ca o justificare pentru a nu se măsura apa de testare și martor pentru substanța de testat pentru perioada rămasă din faza de eliminare.

Peștii sunt eșantionați de cel puțin cinci ori în timpul fazei de absorbție și de cel puțin patru ori în cursul fazei de eliminare pentru substanța de testat. Având în vedere faptul că uneori este dificil de calculat o valoare estimativă rezonabil de precisă pentru BCF pe baza acestui număr de eșantioane (în special atunci când nu se indică o cinetică de ordin întâi de absorbție și eliminare), se recomandă prelevarea de eșantioane mai frecvent în ambele perioade (a se vedea apendicele 4)

Se stabilește conținutul lipidic utilizând același material biologic care a servit la determinarea concentrației substanței de testat, cel puțin la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. În cazul în care acest lucru nu este posibil, se prelevează eșantioane de la cel puțin trei pești independenți pentru a se determina conținutul lipidic la fiecare dintre cele trei momente. Se adaptează în consecință numărul de pești pe bazin la începutul experimentului ([1]). În mod alternativ, în cazul în care nu se detectează cantități semnificative de substanță de testat în peștii martor (și anume, peștii proveniți din populația de stoc), aceștia pot fi analizați numai pentru conținutul lipidic și analiza substanței de testat în grupul (grupurile) de testare (și constanta de viteză de absorbție, constanta de viteză de eliminare și valorilor BCF) poate fi corectată pentru modificări în funcție de conținutul lipidic din grupul martor în timpul testării ([2]).

Peștii morți sau bolnavi nu se analizează pentru substanța de testat sau concentrația lipidică.

În apendicele 4 se găsește un exemplu de calendar acceptabil de eșantionare. Alte calendare pot fi determinate cu ușurință, pe baza valorilor presupuse ale K_{OW}, pentru a calcula timpul de expunere corespunzător unei absorbții de 95 % (a se vedea apendicele 5 pentru calcule).

Se continuă eșantionarea în cursul fazei de absorbție, până la obținerea unei stări staționare (a se vedea apendicele 1, secțiunea definiții și unități) sau până la finalizarea fazei de absorbție (după 28 sau 60 de zile, a se vedea punctele 37 și 38). Înainte de începerea fazei de eliminare, peștii se transferă în vase curate.

Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor

Se prelevează probe de apă pentru analize, de exemplu prin sifonare cu ajutorul unui tub inert, într-un punct central al camerei de testare. Nici procesul de filtrare și nici cel de centrifugare nu separă întotdeauna fracția nonbiodisponibilă de

([1]) În cazul în care conținutul lipidic nu este analizat în aceiași pești precum substanța de testat, peștele trebuie să fie cel puțin de greutate asemănătoare și (dacă este relevant) de același sex.

([2]) Această alternativă este valabilă numai în cazul în care peștii din toate grupurile testate sunt ținuți în grupuri de dimensiuni similare, sunt îndepărtați în conformitate cu același model și hrăniți în același mod. Acest lucru garantează o creștere similară în toate grupurile de testare, în cazul în care concentrația testată este inferioară plajei de valori toxice. În cazul în care creșterea este similară, de asemenea, se preconizează un conținut lipidic similar. O creștere diferită la martor ar indica un efect al substanței și ar invalida studiul.

▼M7

substanță de testat de cea biodisponibilă. În cazul în care se aplică o tehnică de separare, se furnizează întotdeauna o justificare sau o validare a acesteia în raportul de testare, având în vedere dificultățile de biodisponibilitate (25). În special în cazul substanțelor puternic hidrofobe (și anume, substanțele cu log K_{OW}> 5) (12) (26), atunci când ar putea avea loc adsorbția pe matricea de filtrare sau recipientele de centrifugare, eșantioanele nu se supun la aceste tratamente. În schimb, se iau măsuri pentru ca rezervoarele să fie cât mai curate posibil (a se vedea punctul 46) și se monitorizează conținutul de carbon organic total pe parcursul fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea punctul 53). Pentru evitarea unor eventuale probleme de biodisponibilitate redusă, se poate utiliza prelevarea de eșantioane prin tehnici de microextracție în fază solidă în cazul substanțelor cu solubilitate scăzută și al celor puternic hidrofobe.

Peștii prelevați se eutanasiază în mod instantaneu, într-o manieră cât mai umană posibil [pentru măsurători de pești întregi, nu sunt necesare alte procedee decât clătirea cu apă (a se vedea punctul 28) și uscarea peștelui cu hârtie absorbantă]. Se cântărește și se măsoară lungimea totală ([1]).În fiecare pește, greutatea și lungimea măsurate trebuie să fie legate de concentrația de substanță analizată (și conținutul lipidic, dacă este cazul), de exemplu, utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat.

Este preferabil să se analizeze peștii și apa imediat după eșantionare, pentru a se evita orice degradare sau alte pierderi și pentru a calcula în mod aproximativ constantele de viteză de absorbție și de eliminare, în vreme ce testul continuă să se desfășoare. De asemenea, analiza imediată evită întârzierea determinării faptului dacă s-a atins un platou (stare staționară).

În lipsa unei analize imediate, eșantioanele se depozitează printr-o metodă corespunzătoare. Înainte de începerea studiului, se obțin informații cu privire la metodele de depozitare adecvate substanței de testat – de exemplu: congelare, menținere la 4 °C, extracție etc. Durata de depozitare se selectează astfel încât să se asigure că substanța nu s-a degradat în timpul depozitării.

Calitatea metodei analitice

Întrucât întreaga procedură este reglementată, în principal, de exactitatea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța de testat, se verifică în mod experimental ca acuratețea, precizia și reproductibilitatea analizei substanței, precum și recuperarea substanței de testat din apă și pește să fie satisfăcătoare pentru o anumită metodă. Aceasta ar trebui să facă parte din testele preliminare. De asemenea, se are în vedere ca substanța de testat să nu fie detectabilă în apa de diluție utilizată. În cazul în care este necesar, se corectează valorile de concentrație ale substanței de testat în apă și pește obținute în urma testului pentru a reflecta recuperările și valorile de bază furnizate de martori. Pe tot parcursul testării, eșantioanele de pești și de apă se manipulează astfel încât să se minimizeze contaminările și pierderile (de exemplu, rezultate în urma absorbției prin materialul de eșantionare).

Analiza eșantioanelor de pești

În cazul în care se utilizează materiale marcate radioactiv, se poate analiza marcajul radioactiv total (și anume, compușii de origine și metaboliții) sau eșantioanele pot fi purificate astfel încât compusul de origine să poată fi analizat în mod separat. În cazul în care BCF urmează să fie bazat pe substanța mamă, se caracterizează principalii metaboliți cel puțin la sfârșitul fazei de absorbție (a se vedea punctul 6). Metaboliți principali sunt cei care reprezintă ≥ 10 % din reziduurile totale în țesuturile peștilor, cei care reprezintă ≥ 5 % la două puncte de prelevare de probe consecutive, cei care manifestă niveluri de creștere pe durata fazei de absorbție și cei de interes toxicologic cunoscut. În cazul în care BCF pentru întreaga cantitate de pește în ceea ce privește reziduurile totale marcate radioactiv este ≥ 500, poate fi indicat – și

([1]) În plus față de greutate, se înregistrează lungimea totală, deoarece compararea gradului de creștere de lungime în timpul testului este un bun indicator pentru a stabili dacă s-a produs un efect advers.

▼M7

pentru anumite categorii de substanțe, cum ar fi pesticidele, se recomandă cu fermitate – identificarea și cuantificarea metaboliților principali. Cuantificarea acestor metaboliți poate fi solicitată de unele autorități de reglementare. În cazul în care se identifică și se cuantifică produsele de degradare reprezentând ≥ 10 % din reziduuri totale marcate radioactiv în țesuturile peștilor, este recomandat ca acestea să fie identificate și cuantificate, de asemenea, în apa pentru experiment. În cazul în care acest lucru nu este fezabil, se furnizează explicații în cadrul raportului.

În general, concentrația substanței de testat trebuie să fie determinată pentru fiecare pește cântărit. În cazul în care acest lucru nu este posibil, se pot pune în comun eșantioanele la fiecare testare, însă această metodă limitează procedurile statistice care pot fi aplicate datelor, astfel încât ar trebui să se includă în cadrul testului un număr adecvat de pești pentru a face posibilă punerea în comun, procedura și precizia statistică. Referințele (27) și (28) pot fi utilizate ca o introducere la procedurile de punere în comun relevante.

BCF-ul va fi exprimat ca normalizat la o specie de pește cu un conținut de lipide de 5 % (pe baza greutății umede), în plus față de cel obținut în mod direct din studiu (a se vedea punctul 21), cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în special în lipide. Conținutul lipidic al peștilor se determină la fiecare prelevare de probe, dacă este posibil, preferabil pe același extract ca pentru analiza substanței de testat, întrucât adesea lipidele trebuie scoase din extract înainte de a putea fi analizate prin cromatografie. Cu toate acestea, analiza substanțelor de testat necesită adesea proceduri de extracție specifice care ar putea fi în contradicție cu metodele de testare pentru determinarea lipidelor. În acest caz (până când sunt disponibile metode instrumentale nedistructive adecvate), se recomandă utilizarea altei strategii pentru determinarea conținutul lipidic al peștilor (a se vedea punctul 56). Se utilizează metode adecvate pentru determinarea conținutului lipidic (20). Tehnici de extracție prin cloroform/metanol (29) pot fi recomandate ca metode standard (30), dar metoda Smedes (31) este recomandată ca o tehnică alternativă. Această ultimă metodă este caracterizată de o eficiență de extracție comparabilă, un nivel ridicat de acuratețe, utilizarea de solvenți organici mai puțin toxici, precum și ușurința realizării. Se pot utiliza alte metode a căror precizie poate fi comparată în mod favorabil cu metodele recomandate, în cazul în care acestea sunt justificate în mod corespunzător. Este important să se precizeze detaliile metodei utilizate.

Măsurarea creșterii peștilor

La începutul testului, cinci până la zece pești proveniți dintr-o populație stoc se cântăresc în mod individual și se măsoară lungimea totală a acestora. Se pot utiliza aceiași pești ca pentru analiza conținutului lipidic (a se vedea punctul 56). Se măsoară greutatea și lungimea peștilor utilizați pentru fiecare eșantionare din grupul de testare și grupul martor înainte de efectuarea analizei chimice sau a lipidelor. Măsurătorile peștilor incluși în eșantionare pot fi utilizate pentru a estima greutatea și lungimea peștilor rămași în bazinele de testare și martor (a se vedea punctul45).

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

Se obține curba de absorbție a substanței de testat din traseul concentrației sale în funcție de timp, la/în pești (sau în țesuturile specifice), în perioada fazei de absorbție, utilizând o scară aritmetică. În cazul în care curba atinge un platou, și anume aceasta adoptă aproximativ un traseu asimptotic la axa timpului, se va calcula starea staționară BCF (BCF_{SS}) după cum urmează:

$$\frac{C_f \text{la starea staționară}(media)}{C_w \text{la starea staționară}(media)}$$

▼M7

Dezvoltarea C_p poate fi influențată de creșterea peștelui (a se vedea punctele 72 și 73). Concentrația de expunere medie (C_a) este influențată de variația în timp. Se poate estima faptul că o concentrație medie ponderată este mai relevantă și mai precisă pentru studiile de bioacumulare, inclusiv în cazul în care variația se încadrează în plaja de valori de valabilitate corespunzătoare (a se vedea punctul 24). Se poate calcula o medie ponderată de timp (MPT) a concentrației de apă în conformitate cu apendicele 5, secțiunea 1.

Se determină factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_K) ca raportul k_1/k_2, cele două constante cinetice de ordinul întâi. Se obțin constantele de viteză k_1 și k_2 și BCF_K prin montarea simultană atât a fazei de absorbție, cât și a fazei de eliminare. În mod alternativ, k_1 și k_2 se pot determina secvențial (a se vedea apendicele 5 pentru descrierea și compararea acestor metode). Constanta de viteză de eliminare (k_2) ar putea necesita ajustare pentru diluția de creștere (a se vedea punctele 72 și 73). În cazul în care curba de absorbție și/sau de eliminare nu este în mod clar de ordinul întâi, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din apendicele 5) și se solicită consiliere din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică.

Date cu privire la greutatea/lungimea peștelui

Se prezintă sub formă de tabel greutățile umede individuale ale peștilor pentru toate intervalele de eșantionare pentru grupurile de testare și martor în timpul fazelor de absorbție (inclusiv populația de pești la începutul absorbției) și de eliminare. La fiecare pește, greutatea și lungimea măsurate trebuie să fie asociate concentrației chimice analizate, de exemplu utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat. Greutatea este măsura preferată de creștere pentru a corecta valorile BCF cinetică pentru diluția de creștere (a se vedea punctul 73 și apendicele 5 pentru metoda utilizată pentru a determina corectarea datelor pentru diluția de creștere).

Corectarea diluției de creștere și normalizarea conținutului lipidic

Creșterea peștelui în timpul fazei de eliminare poate conduce la o scădere a concentrației chimice măsurată în pești, având ca efect faptul că constanta de viteză de eliminare generală (k_2) este mai mare decât cea care ar rezulta numai în urma proceselor de îndepărtare (de exemplu, respirație, metabolism, egestie). Factorii de bioconcentrare cinetică se corectează pentru a ține cont de diluția de creștere. Un BCF_{SS} va fi influențat de creștere, de asemenea, dar nu este disponibilă o procedură convenită pentru corectarea unui BCF_{SS} pentru creștere. În caz unei creșteri semnificative, se obține, de asemenea, BCF_K corectat pentru creștere (BCF_{Kc}), deoarece acesta poate fi o măsură mai relevantă a factorului de bioconcentrare. Conținuturile lipidice ale peștilor de testat (care sunt strâns legate de bioacumularea substanțelor hidrofobe) pot varia suficient în practică astfel încât să fie necesară normalizarea la un ansamblu de pește a conținutului de lipide (5 % g/g) pentru a prezenta atât factorii de bioconcentrare cinetică, cât și cei de în stare staționară în mod semnificativ, cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide (de exemplu, unele substanțe perfluorinate se pot lega de proteine). În apendicele 5 sunt disponibile ecuații și exemple pentru aceste calcule.

Pentru a corecta un BCF cinetică pentru creștere de diluție, se corectează constanta de viteză de eliminare pentru creștere. Această constantă de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) se calculează scăzând constanta de viteză de creștere (k_c, astfel cum a fost obținută din datele privind greutatea măsurată) din constanta de viteză de eliminare totală (k_2). Se calculează ulterior factorul de bioconcentrare cinetică corectat pentru creștere prin împărțirea constantei de viteză de absorbție (k_1) la constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) (a se vedea apendicele 5).În unele cazuri, această abordare este compromisă. De exemplu, pentru substanțele cu rată de eliminare foarte scăzută testate în pești cu creștere rapidă, k_{2c} derivată poate fi foarte mică și, prin urmare, eroarea în calcularea constantelor de viteză utilizate la derivarea acesteia devine critică și, în unele cazuri, estimările kc pot fi mai mari decât

▼M7

estimările k_2. O abordare alternativă care eludează necesitatea corecției de diluție implică utilizarea datelor de eliminare cu privire la masa de substanță de testat pe pește (pește întreg) în locul datelor cu privire la masa obișnuită de substanță de testat pe unitate de masă de pește (concentrație). Acest lucru poate fi realizat cu ușurință având în vedere faptul că testele în conformitate cu prezenta metodă de testare asociază concentrațiile de țesuturi înregistrate cu greutățile corporale individuale ale peștilor. În apendicele 5 se prezintă procedura simplă pentru efectuarea acestui lucru. Se remarcă faptul că k_2 se raportează în continuare, inclusiv dacă se utilizează această abordare alternativă.

Factorii de bioconcentrare cinetică și în stare staționară se raportează, de asemenea, în raport cu conținutul lipidic implicit al peștilor de 5 % (g/g), cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide. Datele privind concentrația de pește sau BCF sunt normalizate, în conformitate cu raportul dintre 5 % și media reală (individuală) a conținutului lipidic (în % de greutate umedă) (a se vedea apendicele 5).

În cazul în care au fost efectuate analizele chimice și lipidice pe aceiași pești, se utilizează ulterior datele normalizate privind conținutul lipidic al fiecărui pește pentru a calcula un BCF normalizat de lipide. În mod alternativ, în cazul în care creșterea este similară la peștii martor și la cei expuși, se poate utiliza conținutul lipidic al peștilor martori singur pentru corectarea lipidelor (a se vedea punctul 56). În apendicele 5 se prezintă o metodă de calculare a BCF normalizat de lipide.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele se vor interpreta cu precauție atunci când concentrațiile măsurate de soluție experimentală se află la valori apropiate de limita de detecție a metodei de analiză.

Creșterea medie în grupurile de testare și martor, în principiu, nu trebuie să fie diferită în mod semnificativ, pentru a exclude efecte toxice. Se compară constantele de viteză de creștere sau curbele de creștere a celor două grupuri printr-o procedură adecvată ([1]).

Claritatea cu care sunt definite curbele de absorbție și de eliminare dovedește buna calitate a datelor de bioconcentrare. În cazul constantelor de viteză, rezultatul unui test de calitate a ajustării χ^2 dovedește o ajustare de calitate [și anume, procent de eroare de mică măsură (32)] pentru modelul de bioacumulare, astfel încât constantele de viteză pot fi considerate fiabile (a se vedea apendicele 5). În cazul în care se utilizează mai mult de o concentrație de testare, variația constantelor de absorbție/eliminare între cele două concentrații de testare trebuie să fie mai mică de 20 % ([2]). În caz contrar, se poate indica dependența de concentrație. Se înregistrează diferențele considerabile observate la constantele de viteză de absorbție/eliminare între concentrațiile de testare aplicate și se furnizează posibile explicații. În general, limita de încredere de 95 % a BCF din studiile bine concepute se apropie de ± 20 %.

În cazul în care se testează două sau mai multe concentrații, se utilizează rezultatele ambelor sau tuturor concentrațiilor pentru a verifica dacă rezultatele sunt

([1]) Se poate efectua un test t asupra constantelor de viteză de creștere pentru a verifica dacă creșterea diferă între grupurile de testare și martor sau un test F în cazul analizei de varianță. În cazul în care este necesar, un test F sau un test al raportului de probabilitate poate fi utilizat pentru a contribui la alegerea modelului de creștere adecvat [monografia 54, OCDE (32)].

([2]) Aceste procentaje presupun că metodele analitice sunt fiabile, iar timpul de înjumătățire este < 14 zile. În cazul în care metodele de analiză sunt mai puțin fiabile sau timpul de înjumătățire este mărit (considerabil), aceste numere, de asemenea, vor deveni mai mari.

▼M7

coerente și pentru a determina dacă există o dependență de concentrație. În cazul în care se testează o singură concentrație pentru a reduce utilizarea animalelor și/sau a resurselor, se furnizează justificarea utilizării unei singure concentrații.

BCF_{SS} rezultat este îndoielnic în cazul în care BCF_K este mult mai mare decât BCF_{SS}, având în vedere faptul că acest lucru poate fi un indiciu că nu s-a ajuns la starea staționară sau că nu s-a luat în considerare diluția de creștere sau procesele de pierdere. În cazurile în care BCF_{SS} este mult mai mare decât BCF_K, se verifică de erori derivarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare și se reevaluează. O altă procedură de montare ar putea îmbunătăți estimarea BCF_K (a se vedea apendicele 5).

Raport de testare

În afară de informațiile privind substanța de testat indicate la punctul 3, raportul de testare include următoarele informații:

Substanța de testat:

Natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice;

— Datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este adecvat și fezabil din punct de vedere practic etc., (inclusiv conținutul de carbon organic, dacă este necesar).

— Pentru substanțele multicomponente și UVCB (substanțele chimice cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice) descrierea, în măsura în care este posibil, a identității chimice a fiecărui compus și, pentru fiecare dintre aceștia, procentul său din masa totală a substanței. Se rezumă modalitatea prin care metoda analitică utilizată în test reflectă o măsură a concentrației substanței; se descriu toate procedurile analitice, inclusiv precizia metodei, limita de detectare a metodei și limita de cuantificare.

— În cazul marcării radioactive, poziția precisă a atomului (atomilor) marcat (marcați) și procentajul de radioactivitate asociată impurităților.

— Informații referitoare la toxicitatea substanței de testare pentru pești (în mod ideal, speciile testate). Toxicitatea se raportează ca o CL_{50} acută de 96 de ore și NOAEC & LOAEC dintr-un studiu de toxicitate cronică (și anume, un test în primele etape ale vieții sau un test pe ciclul de viață complet, dacă este disponibil).

— Condițiile de depozitare pentru substanța chimică de testat sau substanța de testat și stabilitatea substanței chimice de testat sau substanța de testat în condițiile de depozitare în cazul în care sunt depozitate înainte de utilizare.

Speciile de testare:

Denumire științifică, sușă, sursă, orice tratament prealabil, aclimatizare, vârstă (dacă este relevant), intervalul de dimensiuni (greutate și lungime), etc.

Condiții de testare:

— Procedura de testare utilizată (de exemplu, reînnoire continuă sau semistatică); studiu normal sau concept minimizat (inclusiv motivația și justificarea).

— Tipul și caracteristicile iluminării utilizate și fotoperioada (fotoperioadele).

— Modelul de testare (de exemplu, numărul și dimensiunea camerelor de testare, regimul de înlocuire al volumelor de apă, regimul de încărcare, numărul de replici, numărul de pești pe replică, număr de concentrații de testare, durata fazelor de absorbție și de epurare, frecvența eșantionării pentru pești și pentru apă);

▼M7

— Metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența de reînnoire (solventul, concentrația acestuia și contribuția acestuia la conținutul în carbon organic al apei pentru testare se menționează, dacă este cazul) sau o descriere a sistemului alternativ de dozare.

— Concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviația standard a acestora în vasele de testare, precum și metoda și frecvența de obținere a acestora;

— Sursa de apă de diluție, descrierea tuturor tratamentelor prealabile, rezultatele tuturor demonstrațiilor de aptitudine a peștilor de supraviețuire în această apă și caracteristicile apei: pH, duritate, temperatură, concentrația de oxigen dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă este măsurat), carbonul organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului experimental (dacă este cazul) și orice alte măsurători efectuate.

— Calitatea apei în vasele de testare, pH, duritate, COT, temperatura și concentrația de oxigen dizolvat; metodele utilizate și frecvența măsurătorilor.

— Informații detaliate legate de alimentație, de exemplu, tipul (tipurile) de hrană, sursă, compoziție (cel puțin conținutul lipidic și de proteine, dacă este posibil), regimul de alimentare selectat, cantitatea furnizată și frecvența;

— Informații legate de tratamentul peștilor și al apei eșantionate, inclusiv detalii de preparare, depozitare, extracție, proceduri (și precizia) de analiză a substanței de testat și conținutul lipidic.

— Metodele utilizate pentru randomizarea tratamentului și alocarea peștilor în vasele de testare.

— Data privind introducerea organismelor de testare în soluțiile de testare și durata testului.

— Descrierea testelor de stabilire a intervalului și rezultatele, dacă acestea sunt disponibile.

Rezultate:

— Rezultatele studiilor preliminare efectuate.

— Mortalitatea peștilor martor și a peștilor din fiecare cameră de testare, precum și orice comportament anormal observat.

— Informații cu privire la orice efecte adverse observate.

— Descrierea completă a tuturor procedurilor de analiză chimice utilizate, inclusiv limitele de detecție și cuantificare, variabilitatea și recuperarea.

— Conținutul lipidic al peștilor, inclusiv metoda utilizată și, dacă este derivat, factorul normalizare de lipide (L_n, factor de exprimare a rezultatelor în raport cu conținutul lipidic al peștilor de 5 %).

— Date privind greutatea peștelui (și lungimea) prezentate sub formă de tabel, legate de concentrațiile chimice individuale ale peștilor (și conținutul lipidic, dacă este cazul), atât pentru grupul martor, cât și pentru cel de testare (de exemplu, prin utilizarea unor identificatori unici pentru fiecare pește eșantionat) și calculele privind constanta (constantele) de creștere derivată (derivate).

▼M7

— Date cu privire la concentrația substanței de testat în pește (C_p, legată de indivizi) și în apă (C_a), prezentate sub formă de tabel (cu valori medii pentru grupul de testare și martor, deviația standard și intervalul, dacă este cazul) la momentul fiecărui eșantionări (C_p se exprimă în mg/kg de greutate umedă din întreg peștele sau din anumite țesuturi, de exemplu, lipidele și C_a se exprimă în mg/l). Valorile C_a pentru seria martor (se raportează, de asemenea, concentrația de bază).

— Curbele (inclusiv toate măsurătorile efectuate), evidențiind următoarele elemente (dacă este cazul, concentrațiile pot fi exprimate în raport cu întregul corp și cu conținutul lipidic normalizat la 5 % din animale sau din țesuturile specifice ale acestora):

  — creșterea, și anume, greutate peștelui în timp sau logaritm natural de greutate transformată în funcție de timp (inclusiv constanta de viteză de creștere derivată, k_c);

  — absorbția și eliminarea substanței de testat în pește (pe un grafic);

  — timpul până la starea staționară (dacă se atinge);

  — logaritm natural de concentrație transformată în funcție de timpul de absorbție (inclusiv constanta de viteză de absorbție k_1 derivată);

  — logaritm natural de concentrație transformată (ln concentrație) în funcție de timpul de eliminare (inclusiv constanta de viteză de eliminare k_2 derivată); și

  — curbele fazelor de absorbție și de eliminare, prezentând atât datele, cât și modelul.

— În cazul în care o inspecție vizuală a reprezentării grafice demonstrează aberante extreme, se poate aplica un test de detectare a valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.

— Factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}), în cazul în care starea staționară este (aproape) atinsă.

— Factor de bioconcentrare cinetică (BCF_K) și constantele de viteză de absorbție și de eliminare (k_1 și k_2, împreună cu variațele în k_2 (pantă și ordonata la origine) în cazul în care se utilizează montarea secvențială.

— Limite de încredere, deviația standard (după caz) și metode de calcul/analiză de date pentru fiecare parametru pentru fiecare concentrație de substanță de testat utilizată.

  — Orice informații privind metaboliții substanței de testat marcați radioactiv și acumularea acestora.

  — Constanta (constantele) vitezei de creștere [inclusiv intervalul (intervalele) de încredere de 95 %] și constanta vitezei de eliminare corectată în funcție de creștere (k_{2c}), timpii de înjumătățire și valorile BCF (BCF_{Kc}).

  — Toate situațiile neobișnuite legate de test, orice deviație de la aceste proceduri și orice alte informații relevante.

  — Un tabel recapitulativ al datelor relevante măsurate și calculate, după cum urmează:

▼M7

Constantele de viteză de absorbție și de eliminare și factorii de bioconcentrare (BCF) ai substanței

k_c (constanta de viteză de creștere; ziua^{-1}):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
k_1 (constanta de viteză de absorbție totală; l kg^{-1} ziua^{-1}):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
k_2 (constanta de viteză de eliminare totală; ziua^{-1}):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
k_{2c} (constanta de viteză de eliminare corectată de creștere; ziua^{-1}):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
C_p (concentrația chimică în pește la starea staționară; mg kg^{-1}):	A se introduce valoarea ± DS (2)
C_a (concentrația chimică în apă; mg l^{-1}):	A se introduce valoarea ± DS (2)
L_n (factor de normalizare lipidică):	A se introduce valoarea (3)
BCF_{SS} (BCF la starea staționară; l kg^{-1})	A se introduce valoarea ± DS (2)
BCF_{SSL} (BCF la starea staționară normalizat lipidic; l kg^{-1}):	A se introduce valoarea (3) ± SD (2)
BCF_K (BCF cinetică; l kg^{-1})	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
BCF_{Kc} (BCF cinetică corectat de creștere; l kg^{-1})	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (timpii de înjumătățire corectați de creștere; ziua):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (BCF cinetică normalizat lipidic; l kg^{-1}):	A se introduce valoarea
BCF_{KLC} (BCF cinetică normalizat lipidic corectat de creștere; l kg^{-1}):	A se introduce valoarea

(1) CI: intervalul de încredere (dacă se poate estima)
(2) DS: Deviația standard (dacă se poate estima)

Se evită rezultatele raportate ca „nedetectat/cuantificat la limita de detecție/cuantificare”, prin utilizarea unei metode experimentale preliminare și elaborarea unui model experimental, deoarece astfel de rezultate nu pot fi utilizate pentru calculul constantelor de viteză.

C.13 – II: **TEST MINIMIZAT DE EXPUNERE PRIN APĂ A PEȘTILOR**

INTRODUCERE

Experiența de creștere dobândită în efectuarea și interpretarea testului complet, atât de către laboratoare, cât și de organismele de reglementare, arată că – cu unele excepții – cinetica de ordin întâi se aplică pentru estimarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare. Prin urmare, constantele de viteză de absorbție și de eliminare pot fi estimate cu un număr minim de puncte de eșantionare și BCF cinetică derivat.

Scopul inițial al examinării de modele alternative pentru studiile BCF a fost elaborarea unui test minimizat pentru a fi utilizat într-o etapă de testare intermediară pentru a infirma sau a confirma estimările BCF bazate pe K_{OW} și QSAR

▼M7

și, astfel, să se elimine necesitatea unui studiu complet pentru numeroase substanțe și să se reducă la minim costurile și utilizarea animalelor prin reducerea eșantioanelor și a numărului de secvențe analitice efectuate. Urmărind modelul principal al metodei de testare anterioare pentru a permite integrarea rezultatelor testului în datele existente privind BCF și pentru a facilita efectuarea testelor și interpretarea datelor, obiectivul a fost de a furniza estimări BCF cu o precizie și exactitate adecvate pentru decizii în materie de evaluare a riscurilor. Multe dintre aceleași considerente se aplică la fel ca în testul complet, de exemplu, criteriile de validitate (a se vedea punctul 24) și încheierea unui test în cazul în care se observă absorbție nesemnificativă la finalul fazei de absorbție (a se vedea punctele 16 și 38).

Substanțele care ar fi eligibile pentru modelul testului minimizat aparțin domeniului general pentru care a fost elaborată această metodă de testare și anume, substanțe organice nepolare (a se vedea punctul 49). În cazul în care există orice fel de indiciu că substanța care urmează să fie testată ar putea manifesta un comportament diferit (de exemplu, o abatere clară de la cinetica de ordinul întâi), se efectuează un test complet în scopuri de reglementare.

În general, testul minimizat nu se efectuează pe o perioadă mai scurtă decât testul BCF standard, ci constă în mai puține eșantionări ale peștilor (a se vedea apendicele 6 pentru justificare). Cu toate acestea, perioada de eliminare poate fi redusă în cazul substanțelor cu eliminare rapidă pentru a se evita încadrarea concentrațiilor din pește sub limita de detecție/cuantificare înainte de sfârșitul testului. Un test cu expunere minimizată a peștilor cu o singură concentrație poate fi utilizat pentru a se determina necesitatea unui test complet și, în cazul în care datele utilizate pentru calcularea constantelor de viteză și BCF sunt solide (a se vedea punctul 93), se poate elimina testul complet dacă BCF rezultat este departe de valorile normative de interes.

În unele cazuri, poate fi avantajoasă efectuarea modelului de testare minimizat cu mai mult de o concentrație de testare, ca test preliminar pentru a stabili dacă estimările BCF pentru o substanță sunt dependente de concentrație. În cazul în care estimările BCF din testul minimizat arată o dependență de concentrație, este necesară efectuarea unui test complet. În cazul în care, pe baza unui astfel de test minimizat, estimările BCF nu sunt dependente de concentrație, dar rezultatele nu sunt considerate definitive, atunci orice testare completă ulterioară se poate efectua la o singură concentrație, reducând, prin urmare, utilizarea animalelor în comparație cu un test complet cu două (sau mai multe) concentrații.

Substanțele potențial eligibile pentru testul minimizat trebuie:

— Să fie susceptibile să prezinte cinetici de absorbție și eliminare aproximativ de ordinul întâi, de exemplu rezultate din extrapolarea cu substanțe similare;

— Să aibă o valoare log K_{OW}< 6, cu excepția cazului în care se preconizează un metabolism rapid ([1]);

— Să fie suficient de solubile în apă în ceea ce privește tehnica analitică (a se vedea punctul 24);

— Să fie clar cuantificabile (și anume, concentrațiile trebuie să fie de cel puțin un ordin de mărime mai mare decât limita de cuantificare) atât în pești, cât și în apă, se recomandă marcarea radioactivă (a se vedea punctul 23);

— Să aibă o perioadă de eliminare mai mare decât timpul de înjumătățire preconizat (a se vedea apendicele 5 pentru calcule) sau perioada de eliminare se ajustează în consecință (a se vedea punctul 91). Este permisă o excepție de la această regulă în cazul în care se preconizează un metabolism rapid al substanței.

([1]) Testul minimizat poate fi utilizat, de fapt, pentru a demonstra un metabolism rapid atunci când un astfel de metabolism este preconizat.

▼M7

CALENDAR DE EȘANTIONARE PENTRU STUDIILE CARE URMEAZĂ MODELUL MINIMIZAT

Eșantionarea peștilor

Eșantionarea peștilor este redusă la patru puncte de prelevare:

— La mijlocul și la sfârșitul fazei de absorbție (acestea din urmă fiind, de asemenea, începutul eliminării) de exemplu, după 14 și 28 de zile (33).

— La mijlocul fazei de eliminare și la încheierea studiului (când concentrația substanței este < 10 % din concentrația maximă sau, cel puțin, când se depășește în mod clar un timp de înjumătățire al substanței), de exemplu, după 7 și 14 zile de eliminare (33). În cazul în care se preconizează sau se observă eliminarea rapidă, poate fi necesar să se scurteze perioada de eliminare pentru a se evita concentrații în pește sub limita de cuantificare.

— La măsurarea lipidică, precum în studiul complet.

— La corectarea în funcție de creștere, precum în studiul complet.

— BCF este calculat ca un BCF cinetică.

Eșantionarea probelor de apă

Pentru modelul minimizat, apa va fi prelevată la fel ca în studiul complet (a se vedea punctul 54) sau de cel puțin cinci ori, programate în mod egal pe parcursul fazei de absorbție și săptămânal în faza de eliminare.

Modificări ale modelului

Ținând cont de proprietățile substanței de testat, de estimările valabile QSAR și de scopul specific al studiului, se pot lua în considerare anumite modificări în modelul studiului:

— În cazul în care este necesară o mai mare precizie, se pot utiliza mai mulți pești (6 sau 8 în loc de 4) pentru proba la finalul fazei de absorbție.

— Includerea unui grup „extra” de pești care urmează a fi utilizat în cazul în care eliminarea la 14 zile (sau sfârșitul preconizat al fazei de eliminare) nu a fost suficientă pentru o eliminare adecvată (și anume, > 50 %). În cazul în care durata estimată a fazei de eliminare este mai scurtă sau mai lungă de 14 zile, se adaptează calendarul de eșantionare (și anume, un grup de pește la sfârșitul estimat al fazei de eliminare și un grup după jumătate din acel timp).

— Utilizarea a două concentrații de testare pentru a examina posibila dependență de concentrație. În cazul în care rezultatele testului minimizat, efectuat cu două concentrații de testare, arată că BCF nu este dependent de concentrație (și anume, diferă sub 20 %), o concentrație de testare poate fi considerată suficientă în cadrul unui test complet, în cazul în care se desfășoară unul.

— Se pare că modele de procese de bioacumulare precum cele propuse de Arnot *et al.* (35) pot fi utilizate pentru a contribui la planificarea duratei fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea, de asemenea, apendicele 5).

Calcule

Justificarea acestei abordări constă în faptul că factorul de bioconcentrare într-un test complet poate fi determinat ca un factor de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}) prin calcularea raportului între concentrația substanței de testat în țesutul peștelui și concentrația substanței de testat în apă sau prin calcularea factorului de bioconcentrare cinetică (BCF_K) ca fiind raportul dintre constanta de viteză de absorbție k_1 și constanta de viteză de eliminare k_2. BCF_K este valabil chiar dacă nu se atinge o concentrație în stare staționară a substanței în timpul absorbției, cu condiția ca absorbția și eliminarea să acționeze aproximativ în conformitate cu procesele cinetice de ordinul întâi. Ca minim absolut, sunt necesare două puncte

▼M7

de date pentru estimarea constantelor de viteză de absorbție și de eliminare, unul la sfârșitul fazei de absorbție (și anume, la începutul fazei de eliminare) și unul la sfârșitul (sau după o parte semnificativă a) fazei de eliminare. Punctul de eșantionare intermediar se recomandă ca un control privind cineticile de absorbție și de eliminare ([1]). Pentru calcule, a se vedea apendicele 5 și 6.

Interpretarea rezultatelor

Pentru a evalua validitatea și valoarea informativă a testului, se verifică dacă perioada de eliminare depășește un timp de înjumătățire. De asemenea, BCF_{Km} (BCF cinetică derivat dintr-o test minimizat) se compară cu valoarea BCF_{SS} minimizat (care este BCF_{SS} calculat la sfârșitul fazei de absorbție, presupunând că starea staționară a fost atinsă. Acest lucru poate fi doar presupus, având în vedere faptul că numărul de puncte de prelevare nu este suficient pentru a dovedi acest lucru). În cazul în care $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ minimizat, se preferă valoarea BCF_{SS} minimizat. În cazul în care BCF_{Km} este mai mic de 70 % din valoarea BCF_{SS} minimizat, rezultatele nu sunt valabile și se efectuează un test complet.

În cazul în care testul minimizat furnizează un BCF_{Km} din regiunea oricărei valori de interes de reglementare, se efectuează un test complet. În cazul în care rezultatul este departe de orice valoare care prezintă interes de reglementare (mult mai ridicat sau scăzut), este posibil ca un test complet să nu fie necesar sau se poate efectua un test complet cu o singură concentrație, dacă acest lucru este impus de cadrul de reglementare relevant.

În cazul în care un test complet se dovedește a fi necesar în urma unui test minimizat cu o singură concentrație, acesta poate fi efectuat la o a doua concentrație. În cazul în care rezultatele sunt coerente, se poate renunța la un test complet suplimentar la o concentrație diferită, având în vedere faptul că nu se preconizează ca bioconcentrarea substanței să fie dependentă de concentrație. În cazul în care testul minimizat a fost efectuat la două concentrații și rezultatele nu arată nicio dependență de concentrație, testul complet poate fi efectuat doar la o singură concentrație (a se vedea punctul 87).

Raport de testare

Raportul de testare pentru testul minimizat trebuie să includă toate informațiile solicitate pentru testul complet (a se vedea punctul 81), cu excepția celor care sunt imposibil de elaborat (și anume, o curbă reprezentându-se timpul până la starea staționară și factorul de bioconcentrare în stare staționară; pentru cel din urmă se furnizează, în schimb, BCF_{ss} minimizat). În plus, acesta trebuie să includă, de asemenea, raționamentul pentru utilizarea testului minimizat și BCF_{Km} rezultat.

C.13 – III **TESTUL DE BIOACUMULARE ÎN PEȘTI PRIN EXPUNERE ALIMENTARĂ**

INTRODUCERE

Metoda descrisă în această secțiune se utilizează pentru substanțele în cazul cărora metodologia expunerii prin apă nu este posibilă (de exemplu, din cauza faptului că nu se pot menține concentrații de apă stabile, măsurabile, sau nu pot fi atinse conținuturi corporale adecvate în termen de 60 de zile de expunere; a se vedea secțiunile anterioare privind metoda de expunere prin apă). Trebuie menționat, cu toate acestea, faptul că pentru acest test criteriul final va fi un factor de bioamplificare prin alimentație (BMF) mai degrabă decât un factor de bioconcentrare (BCF) ([2]).

În mai 2001, o nouă metodă pentru testarea bioacumulării substanțelor organice greu solubile în apă a fost prezentată în cadrul conferinței Europa SETAC, care a avut loc la Madrid (36). Această activitate a fost elaborată pornind de la diverse studii de bioacumulare raportate în referințele bibliografice utilizând o metodă de

([1]) În cazul în care se măsoară doar două puncte de date, estimările pentru limitele de încredere pentru BCF_{Km} pot fi efectuate utilizând metode „bootstrap”. În cazul în care sunt disponibile, de asemenea, punctele de date intermediare, limitele de încredere pentru BCF_{Km} pot fi calculate precum în testul complet.

([2]) A se vedea apendicele 1 pentru definiții și unități

▼M7

dozare cu hrană îmbogățită [de exemplu, (37)]. În prima parte a anului 2004, un proiect de protocol (38), conceput pentru a evalua potențialul de bioacumulare al substanțelor organice puțin solubile în apă, pentru care metoda de biocencentrare cu expunere prin apă nu era posibilă, împreună cu un document de fundamentare de referință (39) a fost înaintat unui grup de lucru PBT al UE. Alte justificări furnizate pentru această metodă au fost faptul că potențiala expunere a mediului la substanțe cu solubilitate atât de scăzută (și anume, log K_{OW} >5) se poate efectua prin alimentație [a se vedea (40) (41) (42) (43) (44)]. Din acest motiv, teste cu expunerea prin alimentație sunt menționate în unele dintre regulamentele publicate privind substanțele chimice ([1]). Cu toate acestea, se menționează faptul că în metoda descrisă în prezenta anexă se evită cu prudență expunerea prin faza apoasă și, prin urmare, o valoare BMF din această metodă de testare nu poate fi comparată în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și cea prin alimentație pot fi combinate).

Această secțiune din prezenta metodă de testare se bazează pe protocolul menționat (38) și este o metodă nouă care nu figurează în versiunea anterioară a MT C.13. Acest test alternativ permite investigarea în mod direct a căii de expunere prin alimentație în condiții controlate de laborator.

Potențialii investigatori trebuie să se refere la punctele 1-14 din această metodă pentru informații privind cazurile în care testul cu expunere prin alimentație poate fi preferat în locul testului cu expunere prin apă. Informațiile despre diferite considerații privind substanța sunt stabilite și se iau în considerare înainte de efectuarea unui test.

Utilizarea substanțelor de testat marcate radioactiv poate fi luată în considerare utilizând considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă (a se vedea punctele 6 și 65).

Metoda prin alimentație poate fi utilizată pentru a testa mai multe substanțe în cadrul unui singur test, atât timp cât sunt îndeplinite anumite criterii; acestea sunt examinate suplimentar la punctul 112. Pentru simplificare, prezenta metodologie descrie un test care utilizează o singură substanță de testat.

Testul prin alimentație este similar cu metoda expunerii prin apă din multe puncte de vedere, cu excepția căii de expunere. Prin urmare, multe aspecte ale metodei descrise aici se suprapun cu metoda expunerii prin apă descrisă în secțiunea anterioară. Trimiteri la punctele relevante din secțiunea anterioară au fost efectuate pe cât posibil, însă, din motive de lizibilitate și înțelegere, o anumită suprapunere este inevitabilă.

PRINCIPIUL TESTULUI

Se pot utiliza condiții în flux continuu sau semistatice (a se vedea punctul 4); se recomandă condițiile în flux continuu pentru a limita potențiala expunere a substanței de testat prin apă ca rezultat al oricărei desorbții din hrana îmbogățită sau fecale. Testul este constituit din două faze: absorbția (alimente îmbogățite cu substanța de testat) și eliminarea (hrană curată, netratată) (a se vedea punctul 16). În cursul fazei de absorbție, un grup „de testat” de pești este hrănit cu un regim stabilit de hrană comercială pentru pești, cu compoziție cunoscută, îmbogățită cu substanța de testat, în fiecare zi. În mod ideal, peștii trebuie să consume toată hrana oferită (a se vedea punctul 141). Ulterior, peștii sunt hrăniți cu hrană comercială pentru pești, pură, netratată în cursul fazei de eliminare. În ceea ce privește metoda expunerii prin apă, se pot utiliza mai multe grupuri de testat cu diferite concentrații ale substanței de testat îmbogățită, dacă este necesar, dar pentru majoritatea substanțelor de testat organice puternic hidrofobe este suficient un singur grup de testare (a se vedea punctele 49 și 107). În cazul în

([1]) În sensul Regulamentului (CE) nr. 1907/2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH) (JO L 396, 30.12.2006, p. 1), acest aspect este abordat în documentul „Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment”, Capitolul R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1și figura R7.10-2.

▼M7

care se utilizează condiții semistatice, peștii se transferă într-un mediu nou și/sau o nouă cameră de testare la sfârșitul fazei de absorbție (în cazul în care mediul și/sau aparatele utilizate în faza de absorbție au fost contaminate cu substanță de testat prin percolare). Se măsoară concentrațiile substanței de testat din pești în ambele faze ale testului. În plus față de grupul de pești hrăniți cu dieta îmbogățită (grupul de testat), un grup martor de pești este menținut în condiții identice și hrănit în mod identic, cu excepția faptului că hrana comercială pentru pești nu este îmbogățită cu substanța de testat. Acest grup martor permite ca nivelurile de fond ale substanței de testat să fie cuantificate în peștele neexpus și se utilizează ca punct de comparație pentru orice efect advers legat de tratament observat în grupul (grupurile) de testat ([1]). Aceasta permite, de asemenea, comparații între constantele de viteză de creștere între grupuri ca o verificare a faptului că au fost consumate cantități similare din hrana furnizată (se iau in considerare, de asemenea, eventualele diferențe în ceea ce privește caracteristicile organoleptice ale regimurilor alimentare în explicarea diferitelor constante de viteză de creștere; a se vedea punctul 138). Este important ca, în timpul atât al fazelor de absorbție, cât și de eliminare, grupurile de testat și martor să fie hrănite cu diete echivalente din punct de vedere nutrițional.

O fază de absorbție care durează 7-14 de zile este suficientă, în general, pe baza experienței dezvoltatorilor metodei (38) (39). Acest interval reduce la minimum costurile efectuării testului, asigurând în același timp o expunere suficientă pentru majoritatea substanțelor. Cu toate acestea, în unele cazuri, faza de absorbție poate fi prelungită (a se vedea punctul 127). În cursul fazei de absorbție, concentrația substanței din pești poate să nu atingă starea staționară, astfel încât datele cu privire la tratament și rezultatele acestei metode se bazează, de regulă, pe o analiză cinetică a reziduurilor tisulare. (Notă: Ecuațiile de estimare a timpului până la starea staționară se pot aplica și în cazul de față la fel ca în cazul testului de expunere prin apă- a se vedea apendicele 5). Faza de eliminare începe atunci când peștii sunt hrăniți prima dată cu hrană neîmbogățită și durează, în general, până la 28 de zile sau până când substanța de testat nu mai poate fi cuantificată în peștele întreg, luându-se în considerare varianta cea mai scurtă. Faza de eliminare poate fi scurtată sau prelungită dincolo de 28 de zile, în funcție de variația în timp a concentrațiilor chimice măsurate și de dimensiunile peștilor.

Această metodă permite să se determine timpul de înjumătățire specific substanței ($t_{1/2}$, din constanta de viteză de eliminare, k_2), eficiența asimilării (absorbția în intestine; a), factorul de bioamplificare dietetică cinetică (BMF_K), factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de creștere (BMF_{Kc}), precum și factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de lipide ([2]) (BMF_{KL}) (și/sau factorul de bioamplificare dietetică cinetică corectat de creștere și lipide, BMF_{KcL}) pentru substanța de testat în pește. În ceea ce privește metoda expunerii prin apă, creșterea în greutate a peștelui în timpul testului va avea ca rezultat diluția substanței de testat în peștii care cresc și, prin urmare, BMF (cinetică) va fi subestimat dacă nu va fi corectat pentru creștere (a se vedea punctele 162 și 163). În plus, în cazul în care se estimează că s-a ajuns la starea staționară în faza de absorbție, se poate calcula un BMF în stare staționară orientativ. Există abordări disponibile care fac posibilă estimarea unui factor de bioconcentrare cinetică (BCF_K) pe baza datelor generate în studiul prin alimentație [de exemplu, (44) (45) (46) (47) (48)]. În apendicele 8 se discută avantajele și dezavantajele unor astfel de abordări.

([1]) Pentru majoritatea substanțelor de testat, în mod ideal nu trebuie să existe nicio detecție în apa martor. Concentrațiile de bază trebuie să fie relevante numai pentru materialele naturale (de exemplu, unele metale) și substanțele care sunt omniprezente în mediul înconjurător.

([2]) Întrucât BMF este definit ca raportul dintre concentrația unei substanțe într-un organism cu cea din alimentele organismului la starea staționară, se iau în considerare lipidele prin corectarea în funcție de conținutul lipidic din organism și din alimente, prin urmare este descrisă mai precis ca o „corecție”. Această abordare diferă de „normalizarea” la un conținut lipidic în organism stabilit, astfel cum se efectuează în testul de bioconcentrare cu expunere prin apă.

▼M7

Testul a fost conceput în principal pentru substanțe organice nepolare greu solubile care urmăresc aproximativ cinetica de ordinul întâi și de eliminare în pești. În cazul în care se testează o substanță care nu urmează cinetica de absorbție și de eliminare de ordinul întâi, se utilizează modele mai complexe (a se vedea referințele din apendicele 5) și se solicită consiliere din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică.

BMF se determină în mod normal utilizând analiza substanței de testat din pește întreg (pe baza greutății umede). În cazul în care acest lucru prezintă interes pentru obiectivele studiului, se pot eșantiona anumite țesuturi (de exemplu, mușchi, ficat) dacă peștii sunt împărțiți în părți comestibile și necomestibile (a se vedea punctul 21). În plus, se poate utiliza îndepărtarea și analiza separată a tractului gastrointestinal pentru a determina contribuția la concentrații în pești întregi pentru puncte de eșantionare la finalul fazei de absorbție și la începutul fazei de eliminare sau ca parte a unei abordări a echilibrului masic.

Se măsoară conținutul lipidic al peștilor întregi eșantionați, astfel încât concentrațiile să poată fi corectate pentru lipide, luând în considerare conținutul lipidic atât al alimentației, cât și al peștilor (a se vedea punctele 56 și 57 și apendicele 7).

Se măsoară și se înregistrează greutatea peștilor eșantionați și se asociază cu concentrațiile chimice analizate pentru peștii respectivi (de exemplu, se raportează utilizând un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat) în scopul calculării creșterii care se poate produce în timpul testului. Se măsoară, de asemenea, lungimea totală a peștelui, acolo unde este posibil ([1]). Datele cu privire la greutate sunt necesare, de asemenea, pentru a estima BCF utilizând date privind eliminarea din testul prin alimentație.

INFORMAȚII CU PRIVIRE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

Este necesar ca informațiile referitoare la substanța de testat, astfel cum sunt descrise la punctele 3 și 22, să fie disponibile. O metodă analitică pentru concentrațiile substanței de testat în apă nu este necesară, de regulă; sunt necesare metode cu sensibilitate adecvată pentru măsurarea concentrațiilor în hrana și țesuturile peștilor.

Metoda poate fi utilizată pentru a testa mai multe substanțe în cadrul unui singur test. Cu toate acestea, substanțele de testat trebuie să fie compatibile între ele astfel încât acestea să nu interacționeze sau să își schimbe identitatea chimică la îmbogățirea alimentelor pentru pești.. Obiectivul este ca rezultatele măsurătorilor pentru fiecare substanță testată împreună să nu difere în mare măsură de rezultatele care ar fi furnizate în cazul în care ar fi fost operate teste individuale pentru fiecare substanță de testat. Activitatea analitică preliminară stabilește faptul că fiecare substanță poate fi recuperată dintr-o probă alimentară și tisulară de pește îmbogățită cu mai multe substanțe cu i) recuperări ridicate (de exemplu, > 85 % din valoarea nominală) și ii) sensibilitatea necesară pentru testare. Doza totală a substanțelor testate împreună trebuie să se situeze sub nivelul concentrației combinate care ar putea cauza efecte toxice (a se vedea punctul 51). În plus, posibilele efecte adverse la pește și potențialul efectelor interactive (de exemplu, efecte metabolice) asociate cu testarea mai multor substanțe în mod simultan se iau în considerare în modelul experimental. Se evită testarea simultană a substanțelor ionizabile. În ceea ce privește expunerea, metoda este adecvată, de asemenea, pentru amestecuri complexe (a se vedea punctul 13, cu toate că se vor aplica aceleași limitări în analiză ca pentru orice altă metodă).

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, se aplică următoarele condiții (a se vedea punctul 24):

— Variația de temperatură a apei este mai mică de ± 2 °C în grupurile de tratament și martor

([1]) Lungimea totală se înregistrează, de asemenea, în timpul testării, deoarece este un bun indicator pentru a stabili dacă s-a produs un efect advers.

▼M7

— Concentrația oxigenului dizolvat nu coboară sub 60 % din valoarea de saturație din aer

— Concentrația substanței de testat în hrana pentru pești înaintea și la sfârșitul fazei de absorbție se încadrează în intervalul ± 20 % (pe baza a cel puțin trei eșantioane în ambele momente)

— Se demonstrează un nivel ridicat de omogenitate a substanței în hrană, în activitatea analitică preliminară a dietei îmbogățite; cel puțin trei concentrații ale probelor de substanță prelevate la începutul testului nu trebuie să varieze cu mai mult de 15 % de la valoarea medie

— Concentrațiile substanței de testat nu sunt detectate sau sunt prezente doar la niveluri tipice de urme în hrana neîmbogățită sau în țesuturile peștilor martor în raport cu probele tratate

— Mortalitatea sau alte efecte adverse/maladii atât în grupul martor de pești, cât și în cel de testat trebuie să fie ≤ 10 % la sfârșitul testului; în cazul în care testul se prelungește din orice motiv, efectele adverse în ambele grupuri sunt ≤ 5 % pe lună și ≤ 30 % cumulate. Diferențele semnificative în ceea ce privește creșterea medie între grupul de testare și cel martor de pești de la care au fost eșantionate probe ar putea fi o indicație a unui efect toxic al substanței de testat.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

În cazul în care un laborator nu a mai realizat anterior testul sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea sușei de pești sau a furnizorului, specii diferite de pești, modificare semnificativă a dimensiunii peștelui, a hranei pentru pești sau a metodei de îmbogățire etc.), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică utilizând o substanță de referință. Substanța de referință este utilizată în primul rând pentru a stabili dacă tehnica de îmbogățire este adecvată pentru a asigura un grad maxim de omogenitate și biodisponibilitate al substanțelor de testat. Un exemplu care a fost utilizat în cazul substanțelor nepolare hidrofobe este hexaclorobenzenul (HCB), dar se iau în considerare și alte substanțe cu date fiabile disponibile privind absorbția și bioamplificarea datorită proprietăților periculoase ale HCB ([1]). În cazul în care se utilizează o astfel de substanță, în raportul de testare se prezintă informații de bază privind substanța de referință, inclusiv denumirea, puritatea, numărul CAS, structura, date de toxicitate (dacă sunt disponibile) la fel ca pentru substanțele de testat (a se vedea punctele 3 și 22).

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Se utilizează materiale și aparate astfel cum este descris în metoda expunerii prin apă (a se vedea punctul 26). Se utilizează un sistem de testare în flux continuu sau semistatic care furnizează un volum suficient de apă de diluție în bazinele de testare. Se înregistrează debitul.

Apă

Se utilizează apă de testare astfel cum este descris în metoda de expunere prin apă (a se vedea punctele 27-29). Mediul de testare se caracterizează astfel cum este descris și calitatea acestuia trebuie să se mențină constantă în timpul testului. Conținutul în particule naturale și carbonul organic total trebuie să fie cât mai scăzute posibil (≤ 5 mg/l materie în particule; ≤ 2 mg/l carbon organic total) înainte de începerea testului. COT necesită măsurarea numai înainte de testare ca parte a caracterizării apei de testare (a se vedea punctul 53).

([1]) HCB este enumerat în anexele A și C la Convenția de la Stockholm și în anexele I și III la Regulamentul (CE) nr. 850/2004 privind poluanții organici persistenți (JO L 158, 30.4.2004, p. 7)

▼M7

Regimul alimentar

Se recomandă hrana pentru pește disponibilă comercial (alimente peletizate care plutesc și/sau se scufundă lent) care este caracterizată cel puțin în ceea ce privește conținutul de proteine și de grăsime. Produsul alimentar trebuie să aibă o dimensiune uniformă a peletei pentru a spori eficiența expunerii prin alimentație, și anume peștii vor consuma mai multă hrană în loc să consume bucățile mai mari și să le evite pe cele mai mici. Peletele se dimensionează corespunzător dimensiunii peștilor la începutul testului (de exemplu, se poate utiliza un diametru al peletei de aproximativ 0,6-0,85 mm pentru pești între 3 și 7 cm lungime totală și de 0,85-1,2 mm pentru pești între 6 și 12 cm lungime totală). Se poate ajusta dimensiunea peletei în funcție de creșterea peștilor la începutul fazei de eliminare. În apendicele 7 este prezentat un exemplu de compoziție alimentară adecvată, astfel cum este furnizată comercial. Regimurile alimentare de testare cu un conținut lipidic total între 15 și 20 % (g/g) au fost utilizate frecvent la elaborarea acestei metode. Hrana pentru pești cu o concentrație de lipide atât de ridicată ar putea să nu fie disponibilă în unele regiuni. În astfel de cazuri, studiile se pot efectua cu un nivel inferior de concentrație lipidică în produsul alimentar și, în cazul în care este necesar, se ajustează rata de alimentare în mod corespunzător pentru a menține sănătatea peștilor (pe baza testării preliminare). Conținutul lipidic total din grupul de testare și grupul martor trebuie să fie măsurat și înregistrat înainte de începerea testului și la sfârșitul fazei de absorbție. În raportul de studiu se prezintă datele furnizate de furnizorul comercial de furaje cu privire la analiza nutritivă, umiditate, fibre și cenușă și, dacă este posibil, reziduurile de minerale și de pesticide (de exemplu, poluanții prioritari „standard”).

La îmbogățirea alimentelor cu substanța de testat, se depun toate eforturile posibile pentru a se asigura omogenitatea pe toată durata testului. Se selectează concentrația substanței de testat în alimente pentru grupul de testare, luând în considerare sensibilitatea tehnicii analitice, toxicitatea substanței de testat (CFEO, dacă se cunoaște), precum și proprietățile fizico-chimice relevante. În cazul în care se utilizează, substanța de referință se include, de preferință, la o concentrație de aproximativ 10 % din cea a substanței de testat (sau, în orice caz, cât mai scăzută posibil), se supune unei analize de sensibilitate (de exemplu, pentru hexaclorbenzen, o concentrație în alimente de 1-100 μg/g a fost considerată acceptabilă; a se vedea punctul (47) pentru informații suplimentare privind eficiența de asimilare a HCB].

Substanța de testat poate fi adăugată în hrana pentru pești în mai multe moduri, în funcție de caracteristicile fizice ale acesteia și de solubilitate (a se vedea apendicele 7 pentru mai multe detalii privind metodele de îmbogățire):

— În cazul în care substanța este solubilă și stabilă în trigliceride, aceasta se dizolvă într-o cantitate mică de ulei de pește sau ulei vegetal comestibil înainte de a fi amestecată cu hrana pentru pești. În acest caz, se acordă atenție deosebită pentru a se evita producerea unui raport prea bogat în lipide, luând în considerare conținutul de lipide naturale ale hranei îmbogățite prin adăugarea cantității minime cunoscute de ulei necesară pentru a atinge distribuția și omogenitatea substanței de testat în hrană, sau;

— Hrana se îmbogățește utilizând un solvent organic corespunzător, atât timp cât nu se compromite omogenitatea și biodisponibilitatea [este posibil ca substanța de testat să formeze (micro)cristale în alimente ca urmare a evaporării solventului și nu există soluții facile pentru a demonstra că acest lucru nu a avut loc; a se vedea (49)] sau;

— Lichidele nevâscoase se adaugă direct în hrana pentru pești, dar acestea se amestecă foarte bine pentru a susține omogenitatea și pentru a facilita buna asimilare. Tehnica de amestecare trebuie să asigure omogenitatea alimentelor îmbogățite.

▼M7

Într-un număr redus de cazuri, de exemplu substanțele de testat mai puțin hidrofobe pentru care desorbția din hrană este mai susceptibilă, este posibil să fie necesară acoperirea peletelor pregătite din hrană cu o cantitate mică de ulei de porumb/pește (a se vedea punctul 142). În astfel de cazuri, hrana martor se tratează în mod similar și hrana finală preparată se utilizează pentru măsurarea lipidelor.

În cazul în care se utilizează, rezultatele substanței de referință trebuie să fie comparabile cu datele din studiile de specialitate efectuate în condiții similare, cu o rație alimentară comparabilă (a se vedea punctul 45) și parametrii de referință specifici substanței trebuie să îndeplinească criteriile relevante de la punctul 113 (al 3-lea, al 4-lea și al 5-lea subpunct).

În cazul în care se utilizează un ulei sau un solvent purtător ca vehicul pentru substanța de testat, o cantitate echivalentă din același vehicul (fără substanța de testat) se amestecă cu alimentația martor în vederea menținerii echivalenței cu alimentele îmbogățite. Este important ca, în timpul atât al fazelor de absorbție, cât și de eliminare, grupurile de testat și martor să fie hrănite cu diete echivalente din punct de vedere nutrițional.

Alimente îmbogățite se păstrează în condiții care să mențină stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană (de exemplu, refrigerare) și aceste condiții se raportează.

Alegerea speciilor de pești

Pot fi utilizate speciile de pești specificate pentru expunerea prin apă (a se vedea punctul 32 și apendicele 3). Păstrăvul-curcubeu (*Oncorhynchus mykiss*), crapul (*Cyprinus carpio*) și peștii din specia *Pimephales promelas* au fost utilizați frecvent în studiile de bioacumulare alimentară cu substanțe organice înainte de publicarea prezentei metode de testare. Speciile de testare trebuie să aibă un comportament de hrănire care are ca rezultat consumul rapid al rației alimentare administrate pentru a se asigura că orice factor care influențează concentrația substanței de testat în alimente (de exemplu, percolarea în apă și posibilitatea expunerii prin apă) este menținut la un nivel minim. Se utilizează pește în intervalul de dimensiune/greutate recomandat (a se vedea apendicele 3). Peștii nu trebuie să fie prea mici astfel încât să împiedice facilitarea analizelor pe bază individuală. Speciile testate în timpul unei etape de viață cu creștere rapidă pot complica interpretarea datelor și ratele de creștere ridicate pot influența calcularea eficienței de asimilare ([1]).

Păstrarea peștilor

Criteriile privind aclimatizarea, mortalitatea și acceptarea bolilor sunt aceleași ca pentru metoda expunerii prin apă înainte de a testa conductanța (a se vedea punctele 33-35).

DESFĂȘURAREA TESTULUI

Activitățile desfășurate înainte de studiu și testul de stabilire a intervalului

Sunt necesare activități analitice desfășurate înainte de studiu pentru a demonstra recuperarea substanței din produsele alimentare îmbogățite/țesutul de pește îmbogățit. Un test de stabilire a intervalului pentru a selecta o concentrație adecvată în produsele alimentare nu este întotdeauna necesar. În scopul de a demonstra că nu se observă efecte adverse și pentru a evalua caracteristicile organoleptice ale unei diete îmbogățite, sensibilitatea metodei analitice pentru țesutul și hrana pentru pește, precum și selecția unei rate de alimentare și a intervalelor de eșantionare a probelor adecvate din timpul fazei de eliminare etc., se pot efectua experimente de hrănire preliminare, însă acest lucru nu este obligatoriu. Un studiu preliminar poate fi util pentru a estima numărul de exemplare necesar pentru eșantionare în

([1]) Pentru o creștere rapidă în timpul fazei de absorbție, rația alimentară reală va scădea sub nivelul stabilit la începutul expunerii.

▼M7

cursul fazei de eliminare. Acest lucru poate conduce la o reducere semnificativă a numărului de pești utilizați, în special în cazul substanțelor de testat care sunt deosebit de susceptibile la metabolizare.

Condiții de expunere

Durata fazei de absorbție

Este suficientă, de regulă, o fază de absorbție de 7-14 zile, în cursul căreia un grup de pești este hrănit cu alimentația martor și un alt grup, cu alimentația de testat, în fiecare zi, la un anumit regim, în funcție de speciile testate și de condițiile experimentale, de exemplu între 1-2 % din greutatea corporală (greutate umedă) în cazul păstrăvului-curcubeu. Rata de alimentare se selectează astfel încât să se evite creșterea rapidă și mărirea considerabilă a conținutului lipidic. Dacă este necesar, faza de absorbție poate fi prelungită pe baza experienței practice din studii anterioare sau a cunoștințelor cu privire la absorbția/eliminarea substanței de testat (sau a unui analog) la pești. Începutul testului este definit ca momentul primei hrăniri cu alimente îmbogățite. O zi experimentală începe la momentul hrănirii și se termină cu puțin timp înainte de următoarea hrănire (de exemplu, o oră). Prin urmare, prima zi experimentală de absorbție durează de la prima hrănire cu alimente îmbogățite și se termină cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu alimente îmbogățite. În practică, faza de absorbție se încheie cu puțin timp înainte (de exemplu, o oră) de prima hrănire cu substanță de testat neîmbogățită, având în vedere faptul că peștele va continua să digere hrana îmbogățită și să absoarbă substanța de testat în intervalul de 24 de ore. Este important să se asigure că se atinge un conținut corporal suficient de ridicat (netoxic) de substanță de testat în ceea ce privește metoda analitică, astfel încât să se poată măsura cel puțin un ordin de mărime în scădere în timpul fazei de eliminare. În cazuri speciale, se poate utiliza o fază de absorbție prelungită (până la 28 zile), cu eșantionare suplimentară pentru a obține o imagine de ansamblu asupra cineticii de absorbție. În timpul absorbției, concentrația în pește poate să nu atingă starea staționară. Ecuații pentru estimarea timpului până la starea staționară, indicând durata probabilă necesară pentru a atinge concentrații semnificative în pește, pot fi aplicate în acest caz la fel ca în testul cu expunere prin apă (a se vedea apendicele 5).

În unele cazuri, se poate cunoaște faptul că absorbția substanței în pește timp de 7-14 zile va fi insuficientă pentru ca concentrațiile de hrană să atingă o concentrație în pește destul de ridicată pentru a analiza cel puțin un ordin de mărime în scădere în timpul eliminării, fie din cauza calității slabe a sensibilității analitice sau a eficienței scăzute de asimilare. În astfel de cazuri, poate fi mai avantajos să se extindă faza inițială de hrănire pentru mai mult de 14 zile sau, în special pentru substanțele rapid metabolizabile, să se ia în considerare o concentrație alimentară mai ridicată. Cu toate acestea, se acordă atenție deosebită la menținerea conținutului corporal în timpul absorbției sub nivelul cronic (estimat) al concentrației la care nu se observă niciun efect (CFEO) în țesutul peștilor (a se vedea punctul 138).

Durata fazei de eliminare

Eliminarea durează, în general, până la 28 de zile, începând din momentul în care grupul de pești de testat sunt hrăniți cu hrană pură, netratată după faza de absorbție. Eliminarea începe cu prima hrănire cu hrană „neîmbogățită” mai degrabă decât imediat după ultima hrănire cu hrană „îmbogățită”, întrucât peștii continuă să digere alimentele și să absoarbă substanța de testat în intervalul de 24 de ore, astfel cum se menționează la punctul 126. Prin urmare, primul eșantion în faza de eliminare este prelevat cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu hrană neîmbogățită. Această perioadă de eliminare este concepută pentru a capta substanțele cu un potențial timp de înjumătățire de până la 14 de zile, care este în concordanță cu cel al substanțelor bioacumulabile ([1]), astfel încât 28 de

([1]) Într-un studiu de expunere prin apă, un timp de înjumătățire de 14 zile ar corespunde unui BCF de aproximativ 10 000 L/kg utilizând pești de 1 g cu o rată de absorbție corespunzătoare de aproximativ 500 l/kg/zi [în conformitate cu ecuația lui Sijm *et al* (46)].

▼M7

zile cuprind doi timpi de înjumătățire ai unor astfel de substanțe. În cazul substanțelor foarte bioacumulatoare, poate fi mai avantajos să se prelungească faza de eliminare (dacă acest lucru este indicat prin testări preliminare).

În cazul în care o substanță este eliminată foarte încet, astfel încât un timp de înjumătățire nu poate fi determinat în faza de eliminare, informațiile pot fi suficiente, cu toate acestea, în scopuri evaluative pentru a indica un nivel ridicat de bioacumulare. Pe de altă parte, în cazul în care o substanță este eliminată atât de repede încât nu se poate stabili o concentrație la timpul zero fiabilă (concentrația la finalul absorbției/începutul eliminării, $C_{0,d}$) și k_2 nu poate fi stabilit, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 (a se vedea apendicele 7).

În cazul în care analizele peștilor la intervale mai scurte (de exemplu, 7 sau 14 zile) arată că substanța s-a eliminat sub niveluri cuantificabile înainte de perioada completă de 28 de zile, eșantionarea ulterioară poate fi întreruptă, iar testul încheiat.

În puține cazuri s-a produs o absorbție nemăsurabilă a substanței de testat la sfârșitul perioadei de absorbție (sau cu un al doilea eșantion de eliminare). În cazul în care se poate demonstra că: i) se îndeplinesc criteriile de valabilitate de la punctul 113; și ii) lipsa absorbției nu se datorează altor deficiențe ale testului (de exemplu, durată de absorbție insuficient de lungă, deficiență a tehnicii de îmbogățire a hranei, conducând la o biodisponibilitate scăzută, lipsa de sensibilitate a metodei analitice, neconsumarea alimentelor de către pești etc), studiul se poate încheia fără necesitatea de reefectuare cu o durată de absorbție mai lungă. În cazul în care activitățile preliminare au indicat faptul că acesta ar putea fi un astfel de caz, se recomandă analizarea materiilor fecale, dacă este posibil, ca parte a unei abordări a „echilibrului masic”.

Numărul de pești de experiență

Similar testului de expunere prin apă, se selectează pești de greutate și lungime similare, cu cel mai mic pește având nu mai puțin de două treimi din greutatea celui mai mare (a se vedea punctele 40-42).

Numărul total de pești pentru studiu se selectează pe baza calendarului de eșantionare (un număr minim de un eșantion la finalul fazei de absorbție și patru până la șase eșantioane în cursul fazei de eliminare, dar în funcție de duratele fazelor), luând în considerare sensibilitatea tehnicii analitice, concentrația susceptibilă de a fi atinsă la sfârșitul fazei de absorbție (pe baza cunoștințelor anterioare) si durata de eliminare (în cazul în care cunoștințele anterioare permit estimarea). Se eșantionează cinci până la zece pești la fiecare eveniment, parametrii de dezvoltare (greutate și lungime totală) fiind măsurați înainte de analiza chimică sau lipidică.

Având în vedere variabilitatea inerentă în ceea ce privește dimensiunea, rata de creștere și fiziologia în rândul peștilor și variația probabilă în ceea ce privește cantitatea de hrană administrată consumată de fiecare pește, se eșantionează cel puțin cinci pești la fiecare interval din grupul de testare și cinci pești din grupul martor pentru a stabili în mod adecvat concentrația medie și caracterul variabil al acesteia. Variabilitatea între peștii utilizați este susceptibilă să contribuie mai mult la variabilitatea totală necontrolată în test decât variabilitatea inerentă în metodologiile analitice utilizate și, prin urmare, justifică utilizarea a până la zece pești pentru fiecare punct de prelevare în unele cazuri. Cu toate acestea, în cazul în care concentrațiile de fond ale substanței de testat în peștii martor nu sunt cuantificabile la începutul eliminării, analiza chimică a doi-trei pești martor numai la intervalul de eșantionare final poate fi suficientă atât timp cât peștii martor rămași la toate punctele de eșantionare sunt eșantionați în continuare pentru greutate și lungime totală (astfel încât același număr sunt eșantionați din grupurile de testat și martor pentru creștere). Peștele se păstrează, se cântărește în mod individual, (inclusiv dacă ulterior se dovedește necesară combinarea rezultatelor eșantioanelor) și se măsoară lungimea totală.

▼M7

Pentru un test standard, de exemplu cu o durată de eliminare de 28 de zile, incluzând cinci eşantioane de eliminare, acest lucru înseamnă un total de 59-120 de exemplare din grupul de testat şi 50-110 din grupul martor, presupunând că tehnica analitică a substanţei permite efectuarea analizei conţinutului lipidic pe aceiaşi peşti. În cazul în care analiza lipidică nu poate fi efectuată pe aceiaşi peşti ca analiza chimică şi, de asemenea, utilizarea peştilor martor numai pentru analiza lipidică nu este fezabilă (a se vedea punctul 56), ar fi necesari 15 peşti suplimentari (trei din populaţia stoc la începutul testului, câte trei din grupul martor şi din grupul de testare la începutul eliminării şi câte trei din grupul martor şi grupul de testare la sfârşitul experimentului). În apendicele 4 se prezintă un exemplu de calendar de eşantionare cu numărul de peşti.

Încărcarea

Se utilizează raporturi apă/peşti mărite similare celor utilizate în metoda de expunere prin apă (a se vedea punctele 43 şi 45). Cu toate că regimurile de încărcare peşti/apă nu au un efect asupra concentraţiilor de expunere în cadrul acestui test, se recomandă un regim de încărcare de 0,1-1,0 g de peşte (greutate umedă) la litru de apă pe zi pentru a menţine concentraţii adecvate de oxigen dizolvat şi pentru reduce la minimum stresul organismelor de testare.

Alimentaţia de testare şi hrana

Pe parcursul perioadei de aclimatizare, peştii sunt hrăniţi cu o alimentaţie corespunzătoare, astfel cum este descris mai sus (punctul 117). În cazul în care testul se efectuează în regim dinamic, debitul se suspendă atunci când peştii sunt hrăniţi.

În timpul testului, alimentaţia pentru grupul de testare trebuie să adere la cele descrise mai sus (punctele 116-121). Pe lângă luarea în considerare a factorilor specifici substanţei, a sensibilităţii analitice, a concentraţiei preconizate în alimentaţie în condiţii de mediu şi a nivelurilor de toxicitate cronică/conţinut corporal, selecţia concentraţiei ţintă de îmbogăţire trebuie să ia în considerare caracteristicile organoleptice ale hranei (astfel încât peştele să nu evite consumul). Concentraţia cu îmbogăţire nominală a substanţei de testat se documentează în raport. Pe baza experienţei acumulate, concentraţiile de îmbogăţire încadrate în intervalul 1-1000 µg/g furnizează un interval de lucru practic pentru substanţele de testat care nu prezintă un anumit mecanism toxic. Pentru substanţele care acţionează prin intermediul unui mecanism nespecific, nivelurile de reziduuri tisulare nu trebuie să depăşească 5 µmoli/g de lipide, având în vedere faptul că reziduurile peste acest nivel ar putea prezenta efecte cronice (19) (48) (50) ([1]). În cazul altor substanţe, se acordă atenţie deosebită ca în urma expunerii cumulate să nu se producă efecte adverse (a se vedea punctul 127). Acest lucru este valabil în special în cazul în care se testează mai mult de o substanţă în mod simultan (a se vedea punctul 112).

Cantitatea corespunzătoare din substanţa de testat pot fi utilizată pentru a îmbogăţi hrana pentru peşti prin trei metode, astfel cum sunt descrise la punctul 119 şi în apendicele 7. Metodele şi procedurile de îmbogăţire a hranei se documentează în raport. Hrana netratată se administrează la peştii martor, conţinând o cantitate echivalentă de vehicul de ulei neîmbogăţit în cazul în care acesta a fost utilizat în hrana îmbogăţită pentru faza de absorbţie sau tratată cu solvent „pur” în cazul în care un solvent vehicul a fost utilizat pentru prepararea hranei pentru grupul de testare. Alimentaţia tratată şi cea netratată se măsoară în mod analitic cel puţin în triplicat pentru concentraţia substanţei de testat înainte de începerea şi la sfârşitul fazei de absorbţie. După expunerea la alimentaţia tratată (faza de absorbţie), peştii (ambele grupuri) sunt hrăniţi cu hrană netratată (faza de eliminare).

Peştii sunt hrăniţi cu un regim fix (în funcţie de specie; de exemplu, aproximativ 1-2 % din greutatea corporală umedă în fiecare zi în cazul păstrăvului-curcubeu). Rata de alimentare se selectează astfel încât să se evite creşterea rapidă şi mărirea

([1]) Având în vedere faptul că concentraţiile interne efective pot fi determinate numai după efectuarea testului, este necesară o estimare a concentraţiei interne preconizate (de exemplu, pe baza BMF preconizat şi a concentraţiei în hrană; a se vedea ecuaţia A5.8 în apendicele 5).

▼M7

considerabilă a conținutului lipidic. Se înregistrează rata de alimentare exactă stabilită în timpul experimentului. Hrănirea inițială trebuie să se bazeze pe măsurători de greutate programate ale populației stoc chiar înainte de începerea testului. Cantitatea de hrană se ajustează în funcție de greutățile umede ale peștilor eșantionați la fiecare eveniment de eșantionare pentru a ține cont de creștere pe parcursul experimentului. Greutățile și lungimile peștilor în bazinele de testare și martor pot fi estimate din greutățile și lungimile totale ale peștilor utilizați la fiecare eveniment de eșantionare; nu se cântărește sau măsoară peștele rămas în bazinele de testare și martor. Este important să se mențină aceeași rata de alimentare fixată pe parcursul experimentului.

Hrănirea se observă pentru a asigura faptul că peștii consumă în mod vizibil toată hrana prezentată pentru a garanta utilizarea ratelor de ingestie corespunzătoare în calcule. Se iau în considerare experimentele de hrănire preliminare sau experiența anterioară la selectarea unei rate de alimentare care va garanta că toate produsele alimentare din alimentația pe o zi sunt consumate. În cazul în care produsele alimentare sunt neconsumate în mod sistematic, se poate recomanda să se împartă doza pe o perioadă de hrănire suplimentară în fiecare zi experimentală (de exemplu, înlocuirea hranei pe o zi cu jumătate din cantitatea respectivă, de două ori pe zi). În cazul în care acest lucru este necesar, a doua hrănire trebuie să se efectueze la un termen stabilit și să se programeze astfel încât să treacă o perioada maximă posibilă de timp înainte de eșantionarea peștilor (de exemplu, timpul pentru a doua hrănire este stabilit în prima jumătate a unei zile experimentale).

Cu toate că, în general, peștii consumă rapid hrana, este important să se asigure că substanța rămâne adsorbită în produsele alimentare. Se depun eforturi pentru a evita ca substanța de testat să se disperseze din alimente în apă, expunând astfel peștii la concentrații apoase ale substanței de testat în plus față de administrarea prin alimentație. Acest lucru poate fi realizat prin înlăturarea hranei neconsumate (și a excrementelor) din bazinele de testare și martor în termen de o oră de la hrănire, dar de preferință în termen de 30 de minute. În plus, se poate utiliza un sistem în care apa este curățată în mod continuu printr-un filtru de carbon activ pentru a absorbi orice contaminant „dizolvat”. Sistemele în flux continuu pot contribui la îndepărtarea particulelor de hrană și a substanțelor dizolvate în mod rapid ([1]). În unele cazuri, o tehnică de preparare a alimentelor îmbogățite ușor modificată poate contribui la atenuarea acestei probleme (a se vedea punctul 119).

Lumina și temperatura

Precum în cazul metodei de expunere prin apă (a se vedea punctul 48), se recomandă o fotoperioadă de la 12 la 16 ore și temperatura (± 2 °C) corespunzătoare speciei utilizate pentru testare (a se vedea apendicele 3). Tipul și caracteristicile iluminării trebuie să fie cunoscute și documentate.

Martori

Se utilizează un grup martor, cu pești care sunt hrăniți cu aceeași rată precum grupul de testat, dar fără prezența substanței de testat în hrană. În cazul în care s-a utilizat un ulei sau un solvent vehicul pentru a îmbogăți hrana grupului de testat, hrana pentru grupul martor trebuie să fie tratată în același mod, dar cu absența substanței de testat, astfel încât alimentația grupului de testat și cea a grupului martor să fie echivalente (a se vedea punctele 121 și 139).

([1]) Prezența substanței de testat în mediul de testare ca rezultat al excreției peștilor sau percolarea din hrană este posibil să nu fie complet evitabilă. Prin urmare, o opțiune este măsurarea concentrației substanței de testat în apă la sfârșitul perioadei de absorbție, în special în cazul în care se utilizează un regim semistatic, pentru a verifica dacă a avut loc o expunere prin apă.

▼M7

Frecvența de măsurare a calității apei

Condițiile descrise în metoda expunerii prin apă se aplică și în acest caz, cu excepția faptului că COT nu trebuie măsurată decât înainte de test, ca parte a caracterizării apei de testare (a se vedea punctul 53).

Eșantionarea și analiza peștilor și a alimentației

Analiza eșantioanelor de alimentație

Se analizează eșantioane de alimentație de testat și martor cel puțin în triplicat pentru substanța de testat și pentru conținutul lipidic, cel puțin înainte de începutul și la sfârșitul fazei de absorbție. Metodele de analiză și procedurile pentru asigurarea omogenității hranei se includ în raport.

Eșantioanele se analizează pentru substanța de testat prin metoda stabilită și validată. Se desfășoară activități înainte de studiu pentru a se stabili limita de cuantificare, procentul de recuperare, interferențele și viabilitatea analitică în matricea eșantionului destinată. În cazul în care se testează un material marcat radioactiv, se ține cont de considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă, cu înlocuirea analizei de apă cu analiza alimentației (a se vedea punctul 65).

Analiză peștelui

La fiecare eveniment de eșantionare a peștelui, se vor eșantiona 5-10 exemplare din grupurile de expunere și martor (în unele cazuri, se poate reduce numărul peștilor martor; a se vedea punctul 134).

Evenimentele de eșantionare trebuie să se desfășoare în același moment în fiecare zi experimentală (față de hrănirea experimentală) și se programează astfel încât probabilitatea ca hrana să rămână în intestine în timpul fazei de absorbție și în prima parte din faza de eliminare să fie minimizată pentru a preveni contribuții false la concentrațiile totale de substanță de testat (și anume, peștii eșantionați se îndepărtează la sfârșitul unei zile experimentale, luând în considerare faptul că o zi experimentală începe la momentul hrănirii și se sfârșește la momentul următoarei hrăniri, aproximativ 24 de ore mai târziu). Eliminarea începe cu prima hrănire cu alimente neîmbogățite; a se vedea punctul 128). Primul eșantion din faza de eliminare (eșantionat cu puțin timp înainte de a doua hrănire cu alimente neîmbogățite) este important, având în vedere faptul că extrapolarea cu o zi înainte de această măsurare se utilizează pentru a estima concentrația la momentul zero ($C_{0,d}$, concentrația în pește la sfârșitul absorbției/ începutul eliminării). Opțional, se poate îndepărta tractul gastrointestinal al peștilor și analiza în mod separat la sfârșitul absorbției și în prima și a treia zi de eliminare.

La fiecare eșantionare, peștii se îndepărtează din ambele vase de testare și se tratează în aceeași modalitate ca cea descrisă pentru metoda prin apă (a se vedea punctele 61-63).

Se măsoară concentrațiile substanței de testat în peștele întreg (greutate umedă) cel puțin la sfârșitul fazei de absorbție și în cursul fazei de eliminare atât în grupul martor, cât și cel de testare. În cursul fazei de eliminare, se recomandă patru până la șase puncte de eșantionare (de exemplu, 1, 3, 7, 14 și 28 de zile). Opțional, se poate include un punct de eșantionare suplimentar după 1-3 zile de absorbție pentru a estima eficiența asimilării din faza liniară de absorbție a peștilor încă aproape de începutul perioadei de expunere. Există două abateri principale de la calendar: i) în cazul în care se utilizează o fază de absorbție prelungită pentru a investiga cineticile de absorbție, vor exista puncte de eșantionare suplimentare în timpul fazei de absorbție și, prin urmare, este necesară includerea de pești suplimentari (a se vedea punctul 126); ii) în cazul în care studiul a fost încheiat la sfârșitul fazei de absorbție din cauza unei absorbții nemăsurabile (a se vedea punctul 131). Peștii individuali eșantionați se cântăresc (și se măsoară lungimea totală a acestora) pentru a permite determinarea constantelor de viteză de creștere. Concentrațiile de substanță în anumite

▼M7

țesuturi de pește (comestibile și necomestibile) se pot măsura, de asemenea, la sfârșitul absorbției și la momente selectate în timpul eliminării. În cazul în care se testează un material marcat radioactiv, se ține cont de considerații similare celor pentru metoda expunerii prin apă, cu înlocuirea analizei apei cu analiza alimentației (a se vedea punctul 65).

Pentru utilizarea periodică a unei substanțe de referință (a se vedea punctul 25), este de preferat măsurarea concentrațiilor în grupul de testat la sfârșitul absorbției și la toate momentele de eliminare specificate pentru substanța de testat (pește întreg); concentrațiile necesită măsurare în grupul martor numai la sfârșitul absorbției (pește întreg). În anumite cazuri (de exemplu, dacă tehnicile de analiză pentru substanța de testat și pentru substanța de referință sunt incompatibile, astfel încât ar fi necesari pești suplimentari pentru a urma calendarul de eșantionare), se poate utiliza o abordare diferită, după cum urmează, pentru a reduce la minim numărul necesar de pești suplimentari. Concentrațiile de substanță de referință se măsoară în timpul eliminării numai în zilele 1, 3 și în alte două puncte de eșantionare, selectate astfel încât să se poată efectua estimări fiabile ale concentrației la timpul zero ($C_{0,d}$) și ale k_2 pentru substanța de referință.

În cazul în care este posibil, conținutul lipidic al fiecărui pește se determină la fiecare eșantionare sau cel puțin la începutul și la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. (a se vedea punctele 56 și 67). În funcție de metoda analitică (a se vedea punctul 67 și apendicele 4), ar putea fi posibilă utilizarea acelorași pești pentru determinarea atât a conținutului lipidic, cât și a concentrației substanței de testat. Acest lucru este preferat din motive legate de reducerea numărului de pești. Cu toate acestea, în cazul în care acest lucru nu este posibil, se poate utiliza aceeași abordare ca cea descrisă în metoda expunerii prin apă (a se vedea punctul 56 pentru opțiuni alternative de măsurare a lipidelor). Metoda utilizată pentru a cuantifica conținutul lipidic se documentează în raport.

Calitatea metodei analitice

Se efectuează controale de laborator pentru a se asigura caracterul specific, exactitatea, precizia și reproductibilitatea tehnicii analitice specifice substanței, precum și recuperări ale substanței de testat din pești și din hrană.

Măsurarea creșterii peștilor

La începutul testului se cântărește un eșantion de pești provenit din populația stoc (și se măsoară lungimea totală a acestora). Acești pești se eșantionează cu puțin timp înainte de prima hrănire cu alimente îmbogățite (de exemplu, o oră) și se repartizează la ziua experimentală 0. Numărul de pești pentru acest eșantion trebuie să fie cel puțin același cu cel pentru eșantioanele din timpul testului. Unii dintre pești pot fi aceiași care au fost utilizați pentru analiza lipidelor înainte de începutul fazei de absorbție (a se vedea punctul 153). La fiecare interval de eșantionare, peștii se cântăresc mai întâi și ulterior se măsoară lungimea acestora. Pentru fiecare pește, greutatea măsurată (și lungimea) se leagă de concentrația chimică analizată (și conținutul de lipide, dacă este cazul), utilizând, de exemplu, un cod unic de identificare pentru fiecare pește eșantionat. Măsurătorile acestor pești eșantionați se pot utiliza pentru a estima greutatea (și lungimea) peștilor rămași în bazinele de testat și martor.

Evaluarea experimentală

Se efectuează și se înregistrează zilnic observații ale mortalității. Se efectuează observații suplimentare privind efectele adverse, de exemplu pentru un comportament anormal sau o pigmentare, și se înregistrează. Peștii se consideră morți în cazul în care nu există nicio mișcare respiratorie și nu se poate detecta nicio reacție la un stimul mecanic ușor. Se îndepărtează orice pește mort sau în mod clar muribund.

▼M7

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului se utilizează pentru a obține constanta de viteză de eliminare (k_2) în funcție de greutatea totală umedă a peștilor. Se calculează constanta de viteză de creștere, k_c, bazată pe creșterea medie în greutate a peștilor și se utilizează pentru producerea constantei de viteză de eliminare corectată de creștere k_{2c}, dacă este cazul. În plus, se raportează eficacitatea asimilării (a; absorbția din intestine), factorul de bioamplificare cinetică (BMF_K) (dacă este necesar, corectat de creștere, BMF_{Kc}), valoarea acestuia corectată lipidic (BMF_{KL} sau BMF_{KcL}, în cazul în care a fost corectat de diluția de creștere) și rata de alimentare. De asemenea, în cazul în care se poate efectua o estimare a perioadei de timp până la starea staționară în faza de absorbție (de exemplu, 95 % din starea staționară sau $t_{95} = 3{,}0/k_2$), se poate include o estimare a BMF în starea staționară (BMF_{SS}) (a se vedea punctele 105 și 106 și apendicele 5) în cazul în care valoarea t_{95} indică faptul că condițiile pentru starea staționară ar fi fost îndeplinite. Aceeași corecție lipidică se aplică și acestui BMF_{SS}, precum și BMF derivat cinetic (BMF_K) pentru a genera o valoare corectată lipidic, BMF_{SSL} (a se nota faptul că nu există o procedură convenită disponibilă pentru a corecta un BMF în stare staționară pentru diluție de creștere). În apendicele 7 se prezintă formulele și exemple de calcule. Există abordări disponibile care fac posibilă estimarea unui factor de bioconcentrare cinetică (BCF_K) pe baza datelor generate în studiul prin alimentație. Aceste aspecte sunt prezentate în apendicele 8.

Date cu privire la greutatea/lungimea peștelui

Se prezintă sub formă tabelară, în mod separat pentru grupul de testat și cel martor, greutatea umedă și lungimea fiecărui pește pentru toate perioadele de timp, pentru fiecare zi de eșantionare în timpul fazei de absorbție [populația stoc la începutul absorbției; grupul martor și cel de testat pentru finalul absorbției și, dacă s-a efectuat, faza de început (de exemplu, zilele 1 și 3 de absorbție) și faza de eliminare (de exemplu, zilele 1, 2, 4, 7, 14, 28 pentru grupul martor și de testat)]. Greutatea este măsura preferată de creștere în scopuri de corecție de diluție a creșterii. A se vedea mai jos (punctele 162 și 163) și apendicele 5 pentru metoda (metodele) utilizate pentru a corecta datele pentru diluția de creștere.

Date cu privire la concentrația substanței de testat în pești

Măsurătorile reziduurilor de substanță de testat pentru fiecare pește (sau eșantioane din pești reunite, în cazul în care măsurătorile individuale nu sunt posibile), exprimate în concentrație de greutate umedă (g/g) sunt introduse într-un tabel pentru peștii de testat și martor pentru fiecare moment de eșantionare. În cazul în care a fost efectuată o analiză lipidică pentru fiecare pește eșantionat, atunci se pot obține și prezenta sub formă de tabel concentrații individuale corectate de lipide, în ceea ce privește concentrația lipidică (g/g lipidă).

— Măsurătorile reziduurilor de substanță de testat în fiecare pește (sau eșantioane din pești reunite, în cazul în care măsurătorile individuale nu sunt posibile, a se vedea punctul 66) pentru perioada de eliminare se convertesc în logaritmii naturali ale acestora și se reprezintă grafic în funcție de timp (zi). În cazul în care o inspecție vizuală a graficului arată în mod evident valori aberante, se poate aplica un test pentru detectarea valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.

— Se calculează o corelație a celor mai mici pătrate liniare pentru datele de ln(concentrație) în funcție de eliminare (zi). Panta și ordonata la origine ale liniei sunt raportate ca constanta de viteză de eliminare totală (k_2) și logaritm natural de concentrație la timpul zero derivate ($C_{0,d}$) (a se vedea apendicele 5 și apendicele 7 pentru detalii suplimentare). În cazul în care acest lucru nu este posibil din cauza faptului că concentrațiile se află sub limita de cuantificare pentru al doilea eșantion de eliminare, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 (a se vedea apendicele 7).

— Se calculează variațele în panta și ordonata la origine ale liniei utilizând proceduri statistice standard și se evaluează și se prezintă intervalele de încredere de 90 % (sau 95 %) în jurul acestor rezultate.

▼M7

— Se calculează, de asemenea, concentrația medie măsurată a peștilor pentru ultima zi de absorbție (concentrația la timpul zero măsurată, $C_{0,m}$) și se compară cu valoarea derivată $C_{0,d}$. În cazul în care valoarea derivată este mai mică decât valoarea măsurată, diferența poate sugera prezența de hrană îmbogățită nedigerată în intestine. În cazul în care valoarea derivată este mult mai mare decât valoarea măsurată, aceasta ar putea fi o indicație a faptului că valoarea derivată din datele de eliminare prin regresie liniară este eronată și se efectuează evaluarea din nou (a se vedea apendicele 7).

Viteza de eliminare și factorul de bioamplificare

Pentru a calcula factorul de bioamplificare din date, se obține mai întâi eficacitatea asimilării (absorbția substanței de testat în intestine, α). Pentru a efectua acest lucru, se utilizează ecuația A7.1 din apendicele 7, fiind necesar să se cunoască concentrația derivată în pește la timpul zero al fazei de eliminare ($C_{0,d}$), constanta de viteză de eliminare (totală) (k_2), concentrația în hrană ($C_{hrană}$), constanta de viteză de ingestie (I) și durata perioadei de absorbție (t). Panta și ordonata la origine a relației liniare între ln(concentrație) și timpul de eliminare se raportează ca constanta de viteză de eliminare totală (k_2 = panta) și concentrația la timpul zero ($C_{0,d} = e^{ordonata\ la\ origine}$), așa cum se prezintă mai sus. Valorile derivate se verifică pentru plauzibilitate biologică (de exemplu, eficacitatea de asimilare, ca fracție, nu este mai mare de 1). Se calculează (I) prin împărțirea masei alimentației la masa peștilor hrăniți în fiecare zi (dacă au fost hrăniți la 2 % din greutatea corporală, (I) va fi 0,02). Cu toate acestea, rata de alimentare utilizată la calcul ar putea necesita ajustare pentru creșterea peștilor (acest lucru poate fi realizat utilizând constanta de viteză de creștere cunoscută pentru a estima greutatea peștilor la fiecare moment în timpul fazei de absorbție; a se vedea apendicele 7). În cazurile în care k_2 și $C_{0,d}$ nu pot fi stabilite deoarece, de exemplu, concentrațiile au scăzut sub limita de detecție pentru al doilea eșantion de eliminare, se poate efectua o estimare conservatoare a k_2 și o „limită superioară” pentru BMF_k (a se vedea apendicele 7).

După ce se obține eficacitatea asimilării (α), se poate calcula factorul de bioamplificare prin înmulțirea α cu constanta de viteză de ingestie (I) și împărțirea la constanta de viteză de eliminare (totală) (k_2). În aceeași modalitate se calculează factorul de bioamplificare corectat pentru creștere, dar utilizând constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}; a se vedea punctele 162 și 163). Se poate obține o estimare alternativă a eficacității de asimilare în cazul în care analiza tisulară a fost efectuată pe pești eșantionați în faza inițială, liniară a fazei de absorbție; a se vedea punctul 151 și apendicele 7. Această valoare reprezintă o estimare independentă a eficacității de asimilare pentru un organism în esență neexpus (și anume, peștii sunt aproape la începutul fazei de absorbție). Eficacitatea de asimilare estimată din datele de eliminare este utilizată, de regulă, pentru a obține BMF.

Corecția de lipide și corecția de diluție de creștere

Creșterea peștilor în timpul fazei de eliminare poate conduce la o scădere a concentrațiilor chimice măsurate în pești, având ca efect faptul că constanta de viteză de eliminare totală k_2 este mai mare decât ar rezulta numai din procesele de eliminare (de exemplu, metabolism, egestie) (a se vedea punctul 72). Conținutul lipidic al peștilor de testat (care este strâns legat de bioacumularea substanțelor hidrofobe) și conținutul lipidic al alimentelor pot varia suficient în practică astfel încât să fie necesară corecția acestora pentru a prezenta factorii de bioamplificare într-un mod semnificativ. Factorul de bioamplificare se corectează pentru diluția de creștere (precum se corectează BCF cinetică în metoda de expunere prin apă) și pentru conținutul lipidic al alimentelor în raport cu cel al peștilor (factorul de corecție lipidică). Ecuațiile și exemple pentru aceste calcule sunt disponibile în apendicele 5 și respectiv, apendicele 7.

Pentru corectarea pentru diluția de creștere, se calculează constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) (a se vedea ecuațiile din apendicele 5).

▼M7

Această constantă de viteză de eliminare corectată pentru creștere (k_{2c}) este utilizată ulterior pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat pentru creștere, astfel cum se prezintă la punctul 73.În unele cazuri, această abordare nu este posibilă. O abordare alternativă care eludează necesitatea corecției de diluție implică utilizarea datelor de eliminare cu privire la masa de substanță de testat pe pește (pește întreg) în locul datelor cu privire la masa obișnuită de substanță de testat pe unitate de masă de pește (concentrație). Acest lucru poate fi realizat cu ușurință, întrucât testele în conformitate cu această metodă trebuie să asocieze concentrațiile tisulare înregistrate de greutățile corporale individuale ale peștilor. În apendicele 5 se prezintă procedura simplă de efectuare a acestui lucru. Se remarcă faptul că k_2 se estimează și se înregistrează în continuare, inclusiv în cazul în care se utilizează această abordare alternativă.

Pentru corectarea pentru conținutul lipidic al alimentelor și al peștilor atunci când nu a fost efectuată o analiză lipidică a peștilor eșantionați, se obțin raporturile medii de lipide (g/g) în pești și în alimente ([1]). Se calculează ulterior factorul de corecție de lipide (L_c) prin împărțirea raportului mediu de lipide din pește la raportul mediu de lipide din alimente. Factorul de bioamplificare, corectat sau nu pentru creștere, după caz, se împarte la factorul de corecție lipidică pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat pentru lipide.

În cazul în care au fost efectuate analize chimice și lipidice pe aceiași pești la fiecare punct de eșantionare, se pot utiliza datele tisulare corectate pentru lipide pentru fiecare pește pentru a calcula un BMF corectat pentru lipide în mod direct (a se vedea punctul 37). Reprezentarea grafică a datelor cu privire la concentrația corectată pentru lipide furnizează $C_{0,d}$ pe bază de lipide și k_2. Se poate realiza ulterior analiza matematică utilizând aceleași ecuații din apendicele 7, dar eficacitatea asimilării (a) se calculează utilizând constanta de viteză de ingestie a alimentației corectată pentru lipide (I_{lipid}) și concentrația alimentară pe bază de lipide ($C_{hrană\text{-}lipid}$). Parametrii lipidici corectați sunt utilizați, de asemenea, ulterior pentru a calcula BMF (a se observa faptul că, de asemenea, constanta de corecție de creștere se aplică raportului lipidic, mai degrabă decât greutății umede a peștilor pentru a calcula BMF corectat pentru lipide, corectat pentru creștere BMF_{KcL}).

Interpretarea rezultatelor

Creșterea medie în grupul de testare și în cel martor, în principiu, nu trebuie să fie diferită în mod semnificativ, pentru a exclude efecte toxice. Se compară constantele de viteză de creștere sau curbele de creștere a celor două grupuri printr-o procedură adecvată ([2]).

Raport de testare

După încheierea studiului, se pregătește un raport final care conține informații privind *substanța de testat, specia de testare și condițiile de testare*, astfel cum sunt enumerate la punctul 81 (precum pentru metoda expunerii prin apă). Suplimentar, se solicitată următoarele informații:

Substanța de testat:

— Orice informații privind stabilitatea substanței de testat în hrană preparată;

([1]) Această abordare este specifică studiul prin alimentație, distinct de procedura urmată în expunerea prin apă, prin urmare, a fost utilizat cuvântul „corecție” mai degrabă decât „normalizare”, pentru a evita orice confuzie – a se vedea, de asemenea, nota de subsol de la paragraful 106.

([2]) Se poate efectua un test t asupra constantelor de viteză de creștere pentru a verifica dacă creșterea diferă între grupul de testare și cel martor sau un test F în cazul analizei de varianță. În cazul în care este necesar, un test F sau un test al raportului de probabilitate poate fi utilizat pentru a contribui la alegerea modelului de creștere adecvat [monografia 54, OCDE (32)].

▼M7

Condiții de testare:

— Concentrația nominală a substanței în alimente, tehnica de îmbogățire, cantitatea de vehicul (lipidă) utilizată în procesul de îmbogățire (dacă este utilizat), măsurătorile concentrației de substanță de testat în hrană îmbogățită pentru fiecare analiză (în cel puțin trei exemplare înainte de începutul studiului și la sfârșitul absorbției) și valorile medii obținute;

— În cazul în care se utilizează, tipul și calitatea uleiului purtător sau solvent (clasa, furnizorul etc.), utilizat pentru îmbogățirea alimentelor;

— Tipul de alimente utilizate (analiza proximă ([1]), clasa sau calitatea, furnizorul etc.), rata de alimentare în timpul fazei de absorbție, cantitatea de hrană administrată și frecvența (inclusiv orice modificări bazate pe greutatea peștilor eșantionați);

— Ora la care peștii au fost colectați și eutanasiați pentru analiză chimică pentru fiecare punct de eșantionare (de exemplu, o oră înainte de hrănirea din următoarea zi);

Rezultate:

— Rezultate din orice alte activități efectuate înainte de studiu;

— Informații cu privire la orice efecte adverse observate;

— Descrierea completă a tuturor procedurilor utilizate, inclusiv limitele de detecție și cuantificare, variabilitatea și recuperarea;

— Concentrațiile măsurate de lipide din hrană (îmbogățită și alimentația martor), valorile medii individuale și deviațiile standard;

— Prezentarea sub formă de tabel a datelor cu privire la greutatea (și lungimea) peștilor, asociate cu fiecare pește, atât pentru grupul martor, cât și pentru grupul de expunere (de exemplu, utilizând identificatori unici pentru fiecare pește) și a calculelor, constanta (constantele) de viteză de creștere derivată(e) și intervalul (intervalele) de încredere de 95 %;

— Date prezentate sub formă de tabel cu privire la concentrația substanței de testat în pești, concentrația medie măsurată la sfârșitul absorbției ($C_{0,m}$) și constanta de viteză de eliminare (totală) derivată (k_2) și concentrația în pește la începutul fazei de eliminare ($C_{0,e}$), împreună cu variantele în aceste valori (pantă și ordonata la origine);

— Date prezentate sub formă de tabel cu privire la conținutul lipidic în pești (listat în funcție de concentrații specifice substanței, dacă este cazul), valorile medii pentru grupul de testat și grupul martor la începutul testului, la finalul absorbției și la finalul eliminării;

— Curbele (inclusiv toate măsurătorile efectuate), evidențiind următoarele elemente (dacă este cazul, concentrațiile pot fi exprimate în raport cu întregul corp al animalului sau cu țesuturi specifice ale acestora):

  — creșterea [și anume, greutatea (și lungimea) peștilor în funcție de timp] sau logaritmul natural de greutate transformată în funcție de timp;

([1]) O tehnică de analiză a alimentației pentru determinarea conținutului de proteine, lipide, fibră și cenușă brută; aceste informații sunt disponibile, de regulă, de la furnizorul alimentar.

▼M7

— eliminarea substanței de testat din pești; și

— logaritmul natural de concentrație transformată (ln concentrație) în funcție de timpul de eliminare (inclusiv constanta de viteză de eliminare derivată k_2 și logaritmul natural de concentrație derivată în pești la începutul fazei de eliminare, $C_{0,e}$).

— În cazul în care o inspecție vizuală a reprezentării grafice demonstrează aberante extreme, se poate aplica un test de detectare a valorilor aberante valid din punct de vedere statistic pentru a elimina punctele de date false, precum și o justificare documentată pentru omiterea acestora.

— Constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere și timpul de înjumătățire corectat pentru creștere calculate.

— Eficacitatea de asimilare calculată (α).

— BMF alimentară „brut”, BMF cinetică corectat pentru diluția lipidică și de creștere („brut” și corectat pentru lipide pe baza greutății umede de pește întreg), BMF specific țesuturilor, dacă este cazul.

— Orice informații privind metaboliții substanței de testat marcată radioactiv și acumularea acestora.

— Toate situațiile neobișnuite legate de test, orice deviere de la procedurile respective și orice alte informații relevante.

— Un tabel recapitulativ al datelor relevante măsurate și calculate, după cum urmează:

Constantele de viteză de eliminare și factorii de bioamplificare (BMF_K) ai substanței	
k_c (constanta de viteză de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
k_2 (constanta de viteză de eliminare totală; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI)
k_{2c} (constanta de viteză de eliminare corectată de creștere; $ziua^{-1}$):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (concentrația măsurată la timpul zero, concentrația în pește la sfârșitul absorbției (μg/g):	A se introduce valoarea ± DS (2)
$C_{0,e}$ (concentrația la timpul zero derivată a fazei de eliminare; μg/g):	A se introduce valoarea ± DS (2)
I (rata de ingestie a alimentației stabulită; g alimentație/ g pește/zi):	A se introduce valoarea
I_c (rația alimentară efectivă, ajustată pentru creștere; g alimentație/g pește/zi) (2):	A se introduce valoarea ± DS (2)
$C_{hrană}$ (concentrația chimică în hrană; μg/g):	A se introduce valoarea ± DS (2)
α (eficacitatea de asimilare a substanței):	A se introduce valoarea ± DS (2)
BMF_K (BMF cinetică alimentar):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)
BMF_{Kc} (BMF cinetică alimentar corectat pentru creștere):	A se introduce valoarea (95 % CI) (1)

▼**M7**

Constantele de viteză de eliminare și factorii de bioamplificare (BMF_K) ai substanței	
$t_{1/2c}$ (timpul de înjumătățire corectat pentru creștere în zilele):	A se introduce valoarea ± DS ([2])
Lc (factor de corecție lipidică):	A se introduce valoarea
BMF_{KcL} (BMF cinetică corectat pentru creștere corectat lipidic):	A se introduce valoarea
BMF_{SS-L} (BMF orientativ în starea staționară corectat lipidic) ([2]):	A se introduce valoarea ± DS ([2])

([1]) CI: intervalul de încredere (dacă se poate estima)
([2]) DS: Deviația standard (dacă se poate estima)

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.

(2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.

(5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.

(6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method.*

(7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.

(10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure*.

(11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability.*

(12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability – CO_2 in sealed vessels*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 Aprilie 2012.

(22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.

(23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*

(24) *C*hapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test.*

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 22712280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 11681177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Eficacitatea asimilării (α) este o măsură a cantității relative de substanță absorbită din intestine în organism (α este fără unități, însă acesta este exprimată adesea ca un procent mai degrabă decât ca un raport).

Bioacumularea este cunoscută în general ca un proces în care concentrația substanței într-un organism atinge un nivel care depășește nivelul în mediul respirator (de exemplu, apa pentru un pește sau aerul pentru un mamifer), în alimentație sau în ambele (1).

Bioconcentrarea este creșterea în concentrație a substanței de testat într-un sau la un organism (sau țesuturile specifice ale acestuia) în raport cu concentrația substanței de testat în mediul ambiant.

Factorul de bioconcentrare (BCF sau K_B) la orice moment în timpul fazei de absorbție a acestui test de acumulare este concentrația substanței de testat în/la pești sau țesuturile specifice ale acestora (C_p în mg/kg) împărțită la concentrația substanței în mediul ambiant (C_a în mg/l). BCF este exprimat în $l \cdot kg^{-1}$. Se remarcă faptul că nu sunt luate în considerare corecțiile pentru creștere și/sau un conținut lipidic standard.

Bioamplificarea este creșterea în concentrație a substanței de testat în sau la un organism (sau țesuturile specifice ale acestuia) în raport cu concentrația substanței de testat în hrană.

Factorul de bioamplificare (BMF) este concentrația unei substanțe de testat într-un prădător în raport cu concentrația în prada (sau hrana) prădătorului în starea staționară. În metoda descrisă în prezenta metodă de testare, se evită cu precauție expunerea prin faza apoasă și, prin urmare, o valoare BMF din această metodă de testare nu poate fi comparată în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și prin alimentație pot fi combinate).

Factorul de bioamplificare alimentară (BMF alimentară) este termenul utilizat în prezenta metodă de testare pentru a descrie rezultatul testului de expunere prin alimentație în care expunerea prin faza apoasă este evitată cu prudență și, prin urmare, BMF alimentară din această metodă de testare nu poate fi comparat în mod direct cu o valoare BMF din cadrul unui studiu de teren (în care atât expunerea prin apă, cât și cea prin alimentație pot fi combinate).

Faza de post-expunere sau de eliminare (pierdere) este perioada, în urma transferului peștilor dintr-un mediu care conține substanța de testat într-un mediu care nu conține substanța respectivă, în care se studiază eliminarea (sau pierderea netă) de substanță din peștii de testat (sau din țesuturile specifice).

Constanta de viteză de eliminare (pierdere) (k_2) este valoare numerică ce definește viteza de scădere a concentrației substanței de testat în peștii de testat (sau în țesuturile specifice ale acestora) ca urmare a transferării lor dintr-un mediu care conține substanța de testat într-un mediu care nu conține substanța respectivă (k_2 este exprimată în $ziua^{-1}$).

Carbonul organic dizolvat (COD) este o măsură a concentrației de carbon provenit din surse organice dizolvate în mediile de testare.

Faza de expunere sau de absorbție este perioada în care peștii sunt expuși la substanța de testat.

Constanta de viteză de ingestie (I) este cantitatea medie de hrană consumată de fiecare pește în fiecare zi în raport cu media estimată de greutate corporală totală de pește (exprimată în g hrană /g de pește/zi).

▼M7

Factorul de bioconcentrare cinetică (BCF_K) reprezintă raportul dintre constanta vitezei de absorbție, k_1, și constanta de viteză de eliminare k_2 (și anume, k_1/k_2 – a se vedea definițiile din prezentul apendice). În principiu, valoarea este comparabilă cu BCF_{SS} (a se vedea definiția mai sus), dar pot apărea deviații în cazul în care starea staționară este incertă sau în cazul în care au fost aplicate corecții de creștere la BCF cinetică.

Factorul de bioconcentrare cinetică normalizată lipidic (BCF_{KL}) este normalizat la un pește cu conținut lipidic de 5 %.

Factorul de bioconcentrare cinetică corectat de creștere normalizat lipidic (BCF_{KcL}) este normalizat la un pește cu un conținut lipidic de 5 % și corectat pentru creștere în timpul perioadei de studiu, astfel cum este descris în apendicele 5.

Factorul de bioconcentrare în stare staționară normalizat lipidic (BCF_{SSL}) este normalizat la un pește cu conținut lipidic de 5 %.

O substanță multicomponentă este definită în scopul REACH ca o substanță care are mai mult de un singur component principal prezent într-o concentrație între 10 % și 80 % (g/g).

Coeficientul de partiție octanol-apă (K_{OW}): raportul de solubilitate al unei substanțe în *n*-ctanol și apă, la echilibru [metodele A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; de asemenea, desemnat prin P_{OW}. Logaritmul lui K_{OW} indică potențialul de bioconcentrare al unei substanțe în organismele acvatice.

Carbonul organic sub formă de particule (COP) este o măsură a concentrației de carbon provenit din surse organice în suspensie în mediul de testare.

Microextracție în fază solidă (SPME) este o tehnică analitică fără solvent elaborată pentru sistemele de diluare. În această metodă, o fibră acoperită cu polimer este expusă la faza gazoasă sau lichidă, conținând analitul de interes. În general, se impune un timp minim de analiză, astfel încât să se stabilească condiții de echilibru între fazele solide și lichide în ceea ce privește speciile măsurate. Ulterior, se poate determina concentrația analitului de interes direct din fibră sau după extragerea acestuia din fibră într-un solvent, în funcție de tehnica de determinare.

Se ajunge la o stare staționară în reprezentarea grafică a substanței de testat în pești (C_p) în funcție de timp atunci când curba devine paralelă cu axa timpului și trei analize succesive ale C_p efectuate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se încadrează în limita de ± 20 % a fiecăreia și nu există nicio creștere semnificativă a C_p în timp în perioada dintre prima și ultima analiză succesivă. Atunci când se analizează eșantioane reunite, sunt necesare minimum patru analize succesive. În cazul substanțelor experimentale cu caracteristici de absorbție lente, este preferabil să se opteze pentru intervale de șapte zile.

Factorul de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}) nu se modifică în mod semnificativ în cursul unei perioade de timp prelungite, concentrația substanței de testat din mediul ambiant fiind constantă pe parcursul acestei perioade de timp (a se vedea definiția stării staționare).

Carbonul organic total (COT) este o măsură a concentrației de carbon organic provenit din toate sursele organice din mediul de testare, inclusiv din surse sub formă de particule sau dizolvate.

Constanta de viteză de absorbție (k_1) este valoarea numerică ce definește viteza de creștere a concentrației substanței de testat la/în pești (sau în țesuturile specifice ale acestora) atunci când peștii sunt expuși la substanță respectivă (k_1 este exprimată în $l\ kg^{-1}$ $ziua^{-1}$).

Substanțele cu compoziție necunoscută sau variabilă, produșii de reacție complexă sau materiale biologice sunt cunoscute ca UVCB.

▼**M7**

Substanța chimică este o substanță sau un amestec.

Substanța chimică de testat este orice substanță sau amestec care se testează utilizând această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624637.

(2) Capitolul A.8 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (n-octanol/apă): Metoda agitării flaconului*

(3) Capitolul A.24 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (n-octanol/apă), metoda HPLC.*

(4) Capitolul A.23 din prezenta anexă, *Coeficientul de partiție (1Octanol/Apă): Metoda agitării lente.*

▼M7

Apendicele 2

UNELE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUȚIE DE NIVEL ACCEPTABIL

Componentă	Concentrația limită
Materie sub formă de particule	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Pesticide organofosforice totale	50 ng/l
Pesticide organofluorurate totale plus policlorobifenili	50 ng/l
Clor organic total	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

▼M7

Apendicele 3

SPECII DE PEȘTI RECOMANDATE PENTRU TESTARE

Specii recomandate	Intervalul de temperatură recomandat pentru testare (°C)	Lungimea totală recomandată a animalului de experiență (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra	20 – 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carp	20 – 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck and Schlegel) Medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 – 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Biban-soare	20 – 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Păstrăv curcubeu	13 – 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Ghidrin țepos	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Se remarcă faptul că, în testul propriu-zis, greutatea este preferată ca măsură pentru dimensiune și pentru abaterile constantei de viteză de creștere. Cu toate acestea, este recunoscut faptul că lungimea este o măsură mai practică în cazul în care peștii trebuie să fie selectați prin observație la începutul unui experiment (și anume, din populația stoc).

(3) Acest interval de lungime este indicată în Metode de testare pentru substanțe chimice noi (Testing Methods for New Chemical Substances) etc. bazat pe legea pentru controlul substanțelor chimice din Japonia (Japan's Chemical Substances Control Law, CSCL).

Diverse specii marine și de estuar au fost utilizate la o scară mai mică, de exemplu:

Spot (*Leiostomus xanthurus*)

Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)

Silverside (*Menidia beryllina*)

Shiner perch (*Cymatogaster aggregata*)

English sole (*Parophrys vetulus*)

Staghorn sculpin (*Leptocottus armatus*)

Ghidrin țepos (*Gasterosteus aculeatus*)

Biban de mare (*Dicentracus labrax*)

Obleț (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Peștii de apă dulce menționați în tabelul de mai sus sunt ușor de crescut și/sau foarte disponibili tot timpul anului față de speciile marine sau de estuar, a căror disponibilitate este, în anumite țări, limitată. Aceștia se reproduc și trăiesc atât în fermele piscicole, cât și în laboratoare, în condiții în care maladiile și paraziții se află sub control, astfel încât animalele utilizate vor fi în stare bună de sănătate, cu ascendență genetică cunoscută. Pot fi găsiți aproape în întreaga lume.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Apendicele 4

CALENDARE DE EȘANTIOARE PENTRU TESTELE CU EXPUNERE PRIN APĂ ȘI PRIN ALIMENTAȚIE

1. **Exemplu teoretic de calendar de eșantionare pentru un test complet de bioconcentrare cu expunere prin apă al unei substanțe cu log K_{OW} = 4.**

Eșantionarea peștilor	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de apă (1)	Nr. de pești per eșantion (1)
	Frecvența minimă necesară (zile) (2)	Eșantionarea suplimentară (zile) (2)		
Faza de absorbție				
1	-1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Faza de eliminare				Transferul peștilor în apa fără substanța de testat
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4+3 (6))
TOTAL				40 – 72 (48 – 80) (5)

(1) Valorile dintre paranteze sunt numerele de eșantioane (apă, pești) care trebuie prelevate, în cazul în care se procedează la o eșantionare suplimentară.

(2) Estimarea înaintea testului a lui k_2 pentru un log K_{OW} de 4,0 este de 0,652 zile^{-1}. Durata totală a experimentului este fixată la 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 zile, și anume, 14 zile. Pentru estimarea t_{SS}, a se vedea apendicele 5.

(3) Se eșantionează apa după ce au fost livrate un minim de 3 „volume ale camerei”.

(4) Acești pești sunt eșantionați din populația stoc.

(5) În cazul în care este necesară o precizie mai mare sau studii de metabolism care necesită un număr mai mare de pești, aceștia se eșantionează în special la finalul fazelor de absorbție și de eliminare (a se vedea punctul 40).

(6) Pot fi necesari cel puțin 3 pești suplimentari pentru analiza conținutului lipidic în cazul în care nu este posibil să se utilizeze aceiași pești eșantionați pentru concentrațiile de substanță la începutul testului, la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. NOTĂ: este posibil ca în multe cazuri să se utilizeze numai cei 3 pești martor (a se vedea punctul 56).

▼M7

2. **Exemplu teoretic de calendar de eșantionare pentru testul de bioacumulare prin alimentație al substanței în urma fazei de absorbție de 10 zile și fazei de eliminare de 42 de zile.**

Eșantionarea	Calendarul de eșantionare		Nr. de eșantioane de hrană	Nr. de pești per eșantion	
	Ziua din fază	Eșantioane de pește suplimentare?		Grup de testat	Grupul martor
Faza de absorbție					
1	0	Posibil (1) (2)	3 – group de testat	0	5 – 10
			3 – group martor (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Da (4)	3 – group de testat	10 – 15 (4)	5 – 10
			3 – group martor (1)	(13 – 18) (5)	(8 – 13) (5)
Faza de eliminare					
3	1	Da (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Da (4)		10 – 15 (4)	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Da (4)		10 – 15 (4) (13 – 18) (5)	5 – 10 (8 – 13) (5)
TOTAL				59 – 120 (63 – 126) (4) (5)	50 – 110 (56 – 116) (4) (5)

(1) 3 eșantioane de hrană atât din grupul martor, cât și din grupul de testat, analizate pentru concentrația substanței de testat și conținutul lipidic.

(2) Peștii sunt eșantionați din populația stoc cât mai aproape posibil de începutul studiului; cel puțin 3 pești din populația stoc la începutul testului se eșantionează pentru conținutul lipidic.

(3) Eșantionarea (opțională) la începutul fazei de absorbție furnizează date pentru a calcula asimilarea alimentară a substanței de testat ce pot fi comparate cu eficacitatea asimilării calculată din datele fazei de eliminare

(4) 5 pești suplimentari pot fi eșantionați pentru analiza specifică țesutului.

(5) Pot fi necesari cel puțin 3 pești suplimentari pentru analiza conținutului lipidic în cazul în care nu este posibil să se utilizeze aceiași pești eșantionați pentru concentrațiile de substanță la începutul testului, la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare. NOTĂ: Este posibil ca în multe cazuri să se utilizeze numai cei 3 pești martor (a se vedea punctele 56 și 153).

Notă cu privire la calendarele fazelor și ale eșantionărilor: Faza de absorbție începe cu prima alimentație cu hrană îmbogățită. O zi experimentală durează de la o alimentație până cu puțin timp înainte de următoarea, 24 de ore mai târziu. Prima eșantionare (1 în tabel) se efectuează la puțin timp înainte de prima alimentație (de exemplu, o oră). Eșantionarea în timpul unui studiu se efectuează cu puțin timp înainte de alimentația următoarei zile (și anume, aproximativ 23 de ore după alimentația zilei de eșantionare). Faza de absorbție se încheie cu puțin timp înaintea de prima alimentație cu hrană neîmbogățită, când începe faza de eliminare (peștii din grupul de testat sunt susceptibili să digere încă hrana îmbogățită în intervalul de 24 de ore după ultima alimentație cu hrană îmbogățită). Acest lucru înseamnă că eșantionul de la sfârșitul absorbției se prelevează cu puțin timp înainte de prima alimentație cu hrană neîmbogățită și primul eșantion din faza de eliminare se prelevează cu aproximativ 23 de ore după prima hrănire cu alimentație neîmbogățită.

▼M7

Apendicele 5

CALCULE GENERALE

1. Introducere

2. Estimarea duratei fazei de absorbție

3. Estimarea duratei fazei de eliminare

4. Metodă secvențială: determinarea constantei de viteză de *eliminare* (pierdere) *k2*

5. Metodă secvențială: determinarea constantei de viteză de *absorbție* k1 (numai pentru metoda expunerii prin apă)

6. Metoda simultană pentru a calcula constantele de viteză de absorbție și de eliminare (pierdere) (numai pentru metoda expunerii prin apă)

7. Corecția de diluție de creștere pentru BCF și BMF cinetică

8. Normalizare lipidică la 5 % conținut lipidic (numai pentru metoda expunerii prin apă)

1. INTRODUCERE

Modelul general de bioacumulare acvatică în pești poate fi descris în ceea ce privește procesele de absorbție și de eliminare, ignorând absorbția alimentelor. Ecuația diferențială (dC_p/dt) care prezintă rata fluctuației concentrației în pești (mg·kg^{-1}·ziua^{-1}) este dată de (1):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 \times C_a - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p \qquad \text{[Ecuația A5.1]}$$

Unde

k_1 = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru absorbția în pește (l·kg^{-1}·ziua^{-1}).

k_2 = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru eliminarea din pește (ziua^{-1}).

k_c = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru creșterea peștilor („diluția de creștere”) (ziua^{-1})

k_m = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru transformarea metabolică (ziua^{-1})

k_e = Constanta de viteză de ordinul întâi pentru egestia materiilor fecale (ziua^{-1})

C_a = Concentrația în apă (mg·l^{-1}).

C_p = Concentrația în pește (mg·kg^{-1} greutate umedă).

Pentru substanțele bioacumulatoare, se poate preconiza că o medie ponderată de timp (MPT) este concentrația de expunere cea mai relevantă în apă (C_a), în intervalul admis de fluctuație (a se vedea punctul 24). Se recomandă calcularea unei MPT a concentrației apei în conformitate cu procedura descrisă în apendicele 6 a metodei de testare C.20 (2). Se remarcă faptul că transformarea ln a concentrației apei este adecvată atunci când se preconizează dezintegrarea exponențială între perioadele de reînnoire, de exemplu într-un model de testare în regim semistatic. Într-un sistem dinamic, transformarea ln a concentrațiilor de expunere poate să nu fie necesară. În cazul în care se obțin MPT ale concentrațiilor apei, acestea se raportează și se utilizează în calculele ulterioare.

Într-un test standard al BCF la pești, absorbția și eliminarea pot fi descrise în ceea ce privește două procese cinetice de ordinul întâi.

▼M7

Rata de absorție = $k_1 \times C_a$ [Ecuația A5.2]

Rata de eliminare totală = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_p$ [Ecuația A5.3]

În starea staționară, presupunând că metabolismul și creșterea sunt neglijabile (și anume, valorile k_c și k_m nu pot fi diferențiate de zero), rata de absorbție este egală cu rata de eliminare și, prin urmare, combinarea ecuației A5.2 și a ecuației A5.3 furnizează următoarea relație:

$$BCF = \frac{C_{p-ss}}{C_{a-ss}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Ecuația A5.4]

Unde

$C_{p\text{-}SS}$ = Concentrația în pește în starea staționară (mg kg^{-1} greutate umedă).

$C_{a\text{-}SS}$ = Concentrația în apă în starea staționară (mg l^{-1}).

Raportul dintre k_1/k_2 este cunoscut ca BCFcinetică (BCF_K) și este egal cu BCF în starea staționară (BCF_{SS}) obținută din raportul dintre concentrația în starea staționară în pești și cea în apă, dar pot să apară abateri în cazul în care starea staționară a fost incertă sau în cazul în care au fost aplicate corecții de creștere BCF cinetică. Cu toate acestea, având în vedere faptul că k_1 și k_2 sunt constante, nu este necesară atingerea stării staționare pentru a obține BCF_K.

Pe baza acestor ecuații de ordin întâi, prezentul apendice 5 include calculele generale necesare pentru metodele de bioacumulare cu expunere atât prin apă, cât și prin alimentație Cu toate acestea, punctele 5, 6 și 8 sunt relevante numai pentru metoda expunerii prin apă, dar sunt incluse aici deoarece acestea sunt tehnici „generale”. Metodele secvențiale (punctele 4 și 5) și simultane (punctul 6) permit calcularea constantelor de absorbție și de eliminare care sunt utilizate pentru a determina BCF cinetice. Metodă secvențială pentru a determina k_2 (punctul 4) este importantă pentru metoda alimentară întrucât aceasta este necesară pentru a calcula atât eficacitatea asimilării, cât și BMF. Apendicele 7 prezintă în detaliu calculele care sunt specifice pentru metoda alimentară.

2. ESTIMAREA DURATEI FAZEI DE ABSORBȚIE

Înainte de efectuarea testului, se poate estima k_2 și, prin urmare, un procentaj de timp necesar pentru a ajunge la starea staționară, pornind de la relațiile empirice între k_2 și coeficientul de partiție *n*-octanol/apă (K_{OW}) sau între k_1 și BCF. Se remarcă, cu toate acestea, faptul că ecuațiile de la acest punct se aplică numai atunci când absorbția și eliminarea urmează o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care, în mod clar, acest lucru nu este valabil, se recomandă să se solicite consultanță din partea unui biostatistician și/sau a unui specialist în farmacocinetică în cazul în care se doresc estimări pentru faza de absorbție.

O estimare a k_2 (ziua^{-1}) poate fi obținută prin mai multe metode. De exemplu, următoarele relații empirice se pot utiliza în primă instanță ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); Ecuația A5.5]

sau

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Ecuația A5.6]

Unde $k_1 = 520 \times W^{-0,32}$ (pentru substanțele cu log K_{OW}> 3) (r^2 = 0,85)[(4); Ecuația A5.7]

([1]) Ca în cazul oricărei relații empirice, se verifică dacă substanța de testat se încadrează în domeniul de aplicabilitate a relației

▼M7

Și$BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90)[(5); Ecuația A5.8]

W = greutatea medie a peștelui tratat (grame greutate umedă) la finalul absorbției/începutul eliminării ([1])

Pentru alte relații conexe, *a se vedea* (6). Poate fi avantajoasă aplicarea mai multor modele complicate la estimarea k_2, în cazul în care, de exemplu, este posibil să se producă o metabolizare semnificativă (7) (8). Cu toate acestea, pe măsură ce complexitatea modelului crește, se acordă o atenție mai mare la interpretarea estimărilor. De exemplu, prezența de grupe nitro ar putea indica o metabolizare rapidă, dar acest lucru nu se întâmplă întotdeauna. Prin urmare, utilizatorul trebuie să pună în balanță rezultatele metodei estimative în raport cu structura chimică și orice alte informații relevante (de exemplu, studii preliminare) în ceea ce privește programarea unui studiu.

Timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj de stare staționară poate fi obținut prin aplicarea estimării k_2 din ecuația cinetică generală ilustrând absorbția și eliminarea (cinetica de ordinul întâi), presupunând o creștere și un metabolism neglijabile. În cazul în care are loc o creștere substanțială în cursul studiului, estimările descrise mai jos nu vor fi considerate fiabile. În astfel de cazuri, este mai bine să se utilizeze k_{2c} corectat pentru creștere, astfel cum este descris în continuare (a se vedea punctul 7 din prezentul apendice):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Ecuația A5.9]}$$

Sau, dacă C_a este constantă:

$$\displaystyle C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ecuația A5.10]}$$

Atunci când se apropie de starea staționară ($t \rightarrow \infty$), ecuația A5.10 se poate reduce (a se vedea (9)(10)] la:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Ecuația A5.11]}$$

sau

$$\frac{C_p}{C_a} = \frac{K_1}{K_2} = BCF \qquad \text{[Ecuația A5.12]}$$

Ulterior BCF × C_a este o aproximare la concentrația în pești la starea staționară ($C_{p\text{-}SS}$). [Notă: aceeași abordare poate fi utilizată atunci când se estimează un BMF la stare staționară cu un test alimentar. În acest caz, BCF se înlocuiește cu BMF și C_a cu $C_{hrană}$, concentrația în hrană, în ecuațiile de mai sus]

Ecuația A5. 10 poate fi transcrisă la:

$$C_p = C_{p-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ecuația A5.13]}$$

sau

$$\frac{C_p}{C_{p-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ecuația A5.14]}$$

Prin aplicarea ecuației A5.14, timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară poate fi estimat atunci când k_2 a fost estimat în prealabil utilizând ecuația A5.5 sau cu ecuația A5.6.

Ca orientare, durata optimă statistică a fazei de absorbție pentru producerea de date statistice acceptabile (BCF_K) este perioada necesară pentru ca respectiva curbă a logaritmului concentrației de substanță de testat în pești raportată în

([1]) Greutatea peștelui la finalul fazei de absorbție poate fi estimată din datele din studiile anterioare sau cunoștințele cu privire la susceptibilitatea speciilor de testat la creșterea în mărime dintr-un test tipic inițial de greutate pe o durată tipică de absorbție (de exemplu, 28 de zile).

▼M7

funcție de timp liniar să atingă cel puțin 50 % din starea staționară (și anume, $0,69/k_2$), dar nu mai mult de 95 % din starea staționară (și anume, $3,0/k_2$) (11). În cazul în care acumularea depășește 95 % din starea staționară, calcularea unui BCF_{SS} devine fezabilă.

Timpul necesar pentru a atinge 80 % din starea staționară este (utilizând ecuația A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ecuația A5.15]}$$

sau

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[Ecuația A5.16]}$$

În mod similar, timpul necesar pentru a atinge 95 % din starea staționară este:

$$t_{95} = \frac{-ln\,(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[Ecuația A5.17]}$$

De exemplu, durata fazei de absorbție (și anume, timpul necesar pentru atingerea unui anumit procentaj din starea staționară, de exemplu, t_{80} sau t_{95}) pentru o substanță de testat cu log K_{OW} = 4 ar fi (utilizând ecuația A5.5, ecuația A5.16 și ecuația A5.17):

$$log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ ziua}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ zile(59 ore)}$$

$$\text{sau } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ zile(110 ore)}$$

De asemenea, expresia alternativă:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \ (ore) \qquad \text{[Ecuația A5.18]}$$

se poate utiliza pentru a calcula timpul pentru a atinge starea staționară eficientă (t_{eSS}) (12). În cazul unei substanțe de testat cu log K_{OW} = 4, aceasta are ca rezultat:

$$\&\#x1d461;_{\&\#x1d452;\ SS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{4} + 55,31 = 121 \ hours$$

3. ESTIMAREA DURATEI FAZEI DE ELIMINARE

Se poate estima, de asemenea, timpul necesar pentru a reduce conținutul corporal la un anumit procentaj din concentrația inițială utilizând ecuația generală care ilustrează absorbția și eliminarea [presupunând cinetica de ordinul întâi, a se vedea ecuația A5.9 (1) (13).]

Pentru faza de eliminare, C_a (sau $C_{hrană}$ pentru testul alimentar) este presupusă a fi zero. Ecuația poate fi redusă ulterior la:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_2 C_p \qquad \text{[Ecuația A5.19]}$$

sau

$$C_p = C_{p,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ecuația A5.20]}$$

unde $C_{p,0}$ este concentrația la începutul perioadei de eliminare.

50 la sută eliminare va fi atinsă la momentul (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

sau

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

În mod similar, 95 la sută eliminare va fi atinsă la:

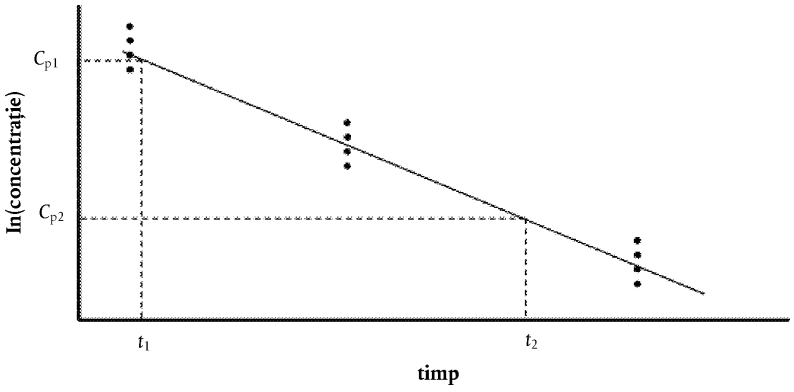
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

În cazul în care se utilizează o rată de absorbție de 80 % pentru prima perioadă ($1{,}6/k_2$) și 95 % pierderi pentru faza de eliminare ($3{,}0/k_2$), atunci faza de eliminare este aproximativ dublul duratei fazei de absorbție.

Se remarcă faptul că aceste estimări se bazează pe ipoteza că schemele de absorbție și eliminare urmează o cinetică de ordinul întâi. În cazul în care se constată că în mod clar nu a fost urmată o cinetică de ordinul întâi, aceste estimări nu sunt valabile.

4. METODĂ SECVENȚIALĂ: DETERMINAREA CONSTANTEI DE VITEZĂ DE ELIMINARE (PIERDERE) K_2

Se presupune că majoritatea datelor de bioconcentrare sunt „rezonabil” de bine descrise printr-un model simplu cu două compartimente/doi parametri, respectiv printr-o curbă rectilinie ce reprezintă aproximativ punctele de măsură a concentrațiilor în pești (pe o scară ln), în cursul fazei de eliminare.



Se remarcă faptul că abaterile de la această linie dreaptă pot indica o schemă de eliminare mai complexă decât cinetica de ordinul întâi. Se poate aplica o metodă grafică pentru a rezolva aceste tipuri de eliminare care se abat de la cinetica de ordinul întâi.

Pentru a calcula k_2 pentru mai multe puncte de timp (eșantionare), se efectuează o regresie liniară a ln(concentrație) în funcție de timp. Panta liniei de regresie este o estimare a constantei de viteză de eliminare k_2 ([1]). Pentru ordonata la origine, concentrația medie în pești la începutul fazei de eliminare ($C_{0,e}$; care este echivalentă cu concentrația medie în pești la finalul fazei de absorbție) poate fi calculată cu ușurință (incluzând marje de eroare) ([2]):

([1]) În majoritatea programelor care permit o regresie liniară, se furnizează, de asemenea, erori standard și intervale de încredere (CI) pentru estimări, de exemplu, în Microsoft Excel, setul de instrumente de analiză a datelor.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[Ecuația A5.21]}$$

Pentru a calcula k_2 atunci când au sunt disponibile numai două puncte de timp (eșantionare) (precum în modelul minimizat), se înlocuiesc cele două concentrații medii în următoarea ecuație

$$k_2 = \frac{\ln (C_{fp}) - \ln (C_{p2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Ecuația A5.22]}$$

Unde $\ln(C_{p1})$ și $\ln(C_{p2})$ sunt logaritmii naturali ai concentrațiilor la momentele t_1 și respectiv t_2 și t_2 și t_1 sunt momentele în care au fost prelevate cele două probe față de începutul eliminării ([1]).

5. METODĂ SECVENȚIALĂ: DETERMINAREA CONSTANTEI DE VITEZĂ DE ABSORBȚIE K_1 (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

În scopul de a afla o valoare pentru k_1 utilizând un ansamblu de date secvențiale ale concentrației în timp pentru faza de absorbție, se utilizează un program pentru calculator care permite următorul model:

$$C_p(t) = C_a(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ecuația A5.23]}$$

Unde k_2 este furnizată de formula de calcul anterioară, C_p (t) și C_a (t) sunt concentrațiile în pește și respectiv, în apă la momentul t.

Pentru a calcula k_1 atunci când sunt disponibile numai două puncte de timp (eșantionare) (precum în modelul minimizat) se utilizează următoarea formulă:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_a(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Ecuația A5.24]}$$

Unde k_2 este furnizat de formula de calcul anterioară, C_p este concentrația în pește la începutul fazei de eliminare și C_a este concentrația medie în apă pe parcursul fazei de absorbție ([2]).

Inspecția vizuală a pantelor k_1 și k_2 reprezentate în funcție de datele măsurate pentru punctele de eșantionare se poate utiliza pentru a evalua calitatea de ajustare. În cazul în care se dovedește că metoda secvențială a furnizat o estimare slabă pentru k_1, se aplică abordarea simultană pentru a calcula k_1 și k_2 (a se vedea următoarea secțiune, 6). Din nou, pantele rezultate se compară cu datele măsurate reprezentate grafic pentru inspecția vizuală a calității ajustării. În cazul în care calitatea ajustării este încă slabă, acesta poate fi un indiciu al faptului că cinetica de ordin întâi nu se aplică și trebuie să se utilizeze alte modele mai complexe.

6. METODA SIMULTANĂ PENTRU A CALCULA CONSTANTELE DE VITEZĂ DE ABSORBȚIE ȘI DE ELIMINARE (PIERDERE) (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

Se pot utiliza programe pentru calculator pentru a identifica valorile pentru k_1 și k_2 utilizând un ansamblu de date secvențiale ale concentrației în timp și modelul:

$$C_p = C_a \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Ecuația A5.25]}$$

$$C_p = C_a \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Ecuația A5.26]}$$

unde

t_c = timpul la finalul fazei de absorbție

Această abordare oferă în mod direct erori standard pentru estimările pentru k_1 și k_2.Atunci când k_1/k_2 este înlocuit de BCF (a se vedea ecuația A5.4) în

([1]) Spre deosebire de metoda regresiei liniare, utilizarea acestei metode nu va genera o eroare standard pentru k2.

([2]) Spre deosebire de o procedură de ajustare liniară, această metodă nu va genera, de regulă, o eroare standard sau un interval de încredere pentru k1 estimat.

▼M7

ecuația A5.25 și ecuația A5.26, se poate estima, de asemenea, eroarea standard și intervalul de încredere de 95 % al BCF. Acest lucru este util în special atunci când se compară diverse estimări datorită transformării datelor. Variabila dependentă (concentrația în pește) poate fi adaptată cu sau fără transformare ln și incertitudinea BCF rezultată poate fi evaluată.

Având în vedere corelația puternică între cei doi parametrii k_1 și k_2 în cazul în care sunt estimați în mod simultan, se recomandă calcularea mai întâi a $k2$ numai din datele de eliminare(a se vedea mai sus); în majoritatea cazurilor $k2$ poate fi estimat cu precizie relativ mare din curba de eliminare. k_1 poate fi calculat ulterior din datele de absorbție utilizând regresia neliniară ([1]). Se recomandă să se utilizeze aceeași transformare a datelor la ajustarea în mod succesiv.

Se poate utiliza inspecția vizuală a pantelor rezultate atunci când sunt reprezentate grafic în funcție de datele măsurate pentru punctele de eșantionare pentru a evalua calitatea ajustării. În cazul în care se dovedește că această metodă a furnizat o estimare slabă pentru k_1, se poate aplica abordarea simultană pentru a calcula k_1 și k_2.Din nou, modelul de ajustare se compară cu datele măsurate grafic pentru inspecția vizuală a calității ajustării și estimările parametrilor rezultate pentru k_1, k_2 și BCF rezultat și erorile standard și/sau intervale de încredere ale acestora se compară între diferite tipuri de ajustare.

În cazul în care calitatea de ajustare este slabă, aceasta poate fi o indicație a faptului că cinetica de ordin întâi nu se aplică și este necesară utilizarea altor modele mai complexe. Una dintre cele mai frecvente complicații este creșterea peștilor în timpul testului.

7. CORECȚIA DE DILUȚIE DE CREȘTERE PENTRU BCF ȘI BMF CINETICĂ

Acest punct descrie o metodă standard de corecție în urma creșterii peștilor în timpul testului (așa-numita „diluție de creștere”), care este valabilă numai în cazul în care se aplică cinetica de ordinul întâi. În cazul în care există indicii că cinetica de ordin întâi nu se aplică, se recomandă să se solicite consultanță din partea unui biostatistician pentru o corecție corespunzătoare de diluție de creștere sau să se utilizeze abordarea bazată pe masă descrisă mai jos.

În unele cazuri, această metodă de corectare a diluției de creștere este condiționată de o lipsă de precizie sau uneori nu funcționează (de exemplu, în cazul substanțelor cu eliminare foarte lentă testate în pești care cresc repede, constanta de viteză de eliminare derivată corectată pentru diluția de creștere, k_{2c}, poate fi foarte mică, ceea ce înseamnă că rata de eroare în cele două constante utilizate la obținerea acesteia devine critică și, în unele cazuri, estimarea k_c poate fi mai mare decât k_2). În astfel de cazuri, poate fi utilizată o abordare alternativă (și anume, abordarea în masă), care funcționează, de asemenea, în cazul în care cineticile de ordin întâi de creștere nu au fost respectate, evitându-se necesitatea de corecție. Această abordare este prezentată la sfârșitul prezentului punct.

Metoda de scădere a constantei de viteză de creștere pentru corecția de creștere

Pentru metoda standard, toate datele individuale de greutate și lungime sunt convertite în logaritmi naturali și ln(greutate) sau ln(1/greutate) se reprezintă grafic în raport cu timpul (zi), în mod separat pentru grupul de tratament și grupul martor. Același proces se efectuează pentru datele din fazele de absorbție și de eliminare, în mod separat. În general, pentru corecția diluției de creștere este mai adecvată utilizarea datelor de greutate din întreg studiul

([1]) Trebuie înțeles faptul că incertitudinea în estimare k2 nu este utilizată în mod corespunzător în modelul de bioacumulare atunci când aceasta este considerată în mod esențial ca fiind constantă la ajustarea k1 în metoda secvențială de ajustare. Incertitudinea BCF rezultată va fi diferită, prin urmare, între metodele simultane sau secvențiale de ajustare.

▼M7

pentru a obține constanta de viteză de creștere (k_c), dar diferențele semnificative din punct de vedere statistic între constantele de viteză de creștere obținute pentru faza de absorbție și faza de eliminare pot indica faptul că ar trebui utilizată constanta de viteză a fazei de eliminare. Se pot utiliza ratele totale de creștere din studiile efectuate pe apă pentru grupurile de testare și martor pentru a verifica eventualele efecte legate de tratament.

Se calculează o corelație liniară a celor mai mici pătrate pentru ln(greutatea peștelui) pe zi [și pentru ln(1/greutate)/zi] pentru fiecare grup (de testat și martor, date individuale, valorii medii nu zilnice) pentru întregul studiu, fazele de absorbție și de eliminare utilizând proceduri statistice standard. Se calculează variațele dintre pantele liniilor și se utilizează pentru a evalua semnificația statistică ($p = 0,05$) a diferenței în pante (constantele de viteză de creștere) prin utilizarea unui test t Student (sau ANOVA, în cazul în care se testează mai mult de o concentrație). Datele privind greutatea sunt preferate, în general, în scopuri de corecție de creștere. Datele cu privire la lungime, tratate în același mod, pot fi utile la realizarea unei comparații între grupurile martor și de testat în ceea ce privește efectele legate de tratament. În cazul în care nu există nicio diferență semnificativă din punct de vedere statistic în analiza datelor cu privire la greutate, se pot reuni datele de testare și martor și se poate calcula o constantă de viteză de creștere totală a peștilor pentru studiu (k_c) ca pantă totală a corelației liniare. În cazul în care se observă diferențe semnificative din punct de vedere statistic, se raportează separat constantele vitezei de creștere pentru fiecare grup de pești și/sau fază de studiu. Se utilizează ulterior constanta de viteză de la fiecare grup în scopuri de corecție de diluție de creștere pentru grupul respectiv. În cazul în care se notează diferențe statistice între constantele de viteză ale fazei de absorbție și de eliminare, se utilizează constante de viteză determinată din faza de eliminare.

Constanta de viteză de creștere calculată (k_c exprimată în ziua^{-1}) poate fi scăzută din constanta de viteză de eliminare totală (k_2) pentru a furniza constanta de viteză de eliminare, k_{2c}.

$$k_{2\ c} = k_2 - k_c \qquad \text{[Ecuația A5.27]}$$

Constanta de viteză de absorbție este împărțită la constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere pentru a furniza BCF cinetică corectat pentru creștere, desemnat BCF_{Kc} (sau BMF_{Kc}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2c}} \qquad \text{[Ecuația A5.28]}$$

Constanta de viteză de creștere determinată pentru un studiu alimentar este utilizată în ecuația A7.5 pentru calcularea BMF_{Kc} corectat pentru creștere (a se vedea apendicele 7).

Metoda bazată pe masă pentru corecția de creștere

O alternativă la „metoda de scădere a constantei de viteză de creștere” de mai sus care evită necesitatea de a efectua corecții pentru creștere poate fi utilizată după cum urmează. Principiul este de a utiliza datele de eliminare pe o bază de masă pe pește întreg, mai degrabă decât pe baza unei concentrații.

Se convertesc concentrațiile tisulare din faza de eliminare (masa substanței de testat/unitate de masă a peștelui) în masa substanței de testat/pește: se potrivesc concentrațiile și greutățile corporale individuale sub formă de tabel (de exemplu, cu ajutorul unei foi de calcul pe un calculator) și se înmulțește fiecare concentrație cu greutatea totală de pește pentru ca această măsurare să furnizeze un set de mase ale substanței de testat/peștelui pentru toate eșantioanele din faza de eliminare.

Se reprezintă grafic logaritmul natural rezultat ale datelor masei substanței de testat în funcție de timp pentru experiment (faza de eliminare), astfel cum ar fi efectuat în mod normal.

▼M7

Pentru metoda expunerii prin apă, se obține constanta de viteză de absorbție pentru fiecare zi (a se vedea punctele 4 și 6) (se remarcă faptul că valoarea „normală” k_2 se utilizează în interpolarea ecuațiilor pentru k_1) și se obține constanta de viteză de eliminare pentru datele de mai sus. Deoarece valoarea rezultată pentru constanta de viteză de eliminare este independentă de creștere întrucât a fost determinată pe o bază de masă pe pește întreg, se notează ca k_{2c} și nu k_2.

8. NORMALZARE LIPIDICĂ LA 5 % CONȚINUT LIPIDIC (NUMAI PENTRU METODA EXPUNERII PRIN APĂ)

Rezultatele BCF (cinetică și la starea staționară) din studiile de expunere prin apă se raportează, de asemenea, în raport cu conținutul lipidic implicit de 5 % greutate umedă, cu excepția cazului în care se poate argumenta faptul că substanța de testat nu se acumulează în principal în lipide (de exemplu, unele substanțele perfluorinate se pot lega de proteine). Datele cu privire la concentrația peștelui sau BCF trebuie să fie convertite la un conținut lipidic de 5 % pe baza greutății umede. În cazul în care au fost utilizați aceiași pești pentru măsurarea concentrațiilor substanței și a conținutului lipidic la toate punctele de eșantionare, acest lucru necesită corectarea fiecărei concentrații măsurate în pește pentru conținutul lipidic al peștilor respectivi.

$$C_{p,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_p \qquad \text{[Ecuația A5.29]}$$

unde

C_{pL} = concentrația în pește normalizată lipidic (mg kg^{-1} greutate umedă)

L = raportul lipidic (pe baza greutății umede)

C_p = concentrația substanței de testat în pește (mg kg^{-1} greutate umedă)

În cazul în care analiza lipidelor nu a fost efectuată pe toți peștii eșantionați, se utilizează o valoare medie a lipidelor pentru normalizarea BCF. Pentru BCF în starea staționară, se utilizează valoarea medie înregistrată la finalul fazei de absorbție în grupul de tratament. Pentru normalizarea unui BCF cinetică, pot exista unele cazuri în care se justifică o abordare diferită, de exemplu în cazul în care conținutul lipidic s-a schimbat radical în cursul fazelor de absorbție și de eliminare. Cu toate acestea, se utilizează în mod curent o rată de alimentare care minimizează modificările dramatice în conținutul lipidic.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Ecuația A5.30]}$$

unde

BCF_{KL} = BCF cinetică normalizat lipidic (L kc^{-1})

L_n = raportul lipidic mediu (pe baza greutății umede)

BCF_K = BCF cinetică (L kc^{-1})

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna Reproduction Test*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼M7

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Apendicele 6

SECȚIUNEA DE ECUAȚII PENTRU TESTUL DE EXPUNERE PRIN APĂ: MODEL DE TESTARE MINIMIZAT

Justificarea acestei abordări constă în faptul că factorul de bioconcentrare într-un test complet poate fi determinat ca un factor de bioconcentrare în stare staționară (BCF_{SS}) prin calcularea raportului între concentrația substanței de testat în țesutul peștelui și concentrația substanței de testat în apă sau prin calcularea factorului de bioconcentrare cinetică (BCF_K) ca fiind raportul dintre constanta de viteză de absorbție k_1 și constanta de viteză de eliminare k_2. BCF_K este valabil chiar dacă nu se atinge o concentrație în stare staționară a substanței în timpul absorbției, cu condiția ca absorbția și eliminarea să acționeze aproximativ în conformitate cu procesele cinetice de ordinul întâi.

În cazul în care se efectuează o măsurare a concentrației de substanță în țesuturi (C_{p1}) în momentul în care expunerea se încheie (t_1) și concentrația în țesut (C_{p2}) se măsoară din nou după scurgerea unui anumit interval de timp (t_2), se poate estima constanta de viteză de eliminare k_2) utilizând ecuația A5.22 din apendicele 5.

Ulterior se poate determina algebric constanta de viteză de absorbție, k_1, utilizând ecuația A5.23 din apendicele 5 (unde $C_p = C_{p1}$ și $t = t_1$) (1). Factorul de bioconcentrare cinetică pentru modelul minimizat (desemnat ca BCF_{Km} pentru a se distinge de factorii de bioconcentrare determinați utilizând alte metode) este:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ecuația A6.1]}$$

Se corectează concentrațiile și rezultatele pentru diluția de creștere și se normalizează la un conținut lipidic în pește de 5 %, astfel cum este descris în apendicele 5.

BCF_{SS} minimizat este BCF calculat la finalul fazei de absorbție, presupunând că starea staționară a fost atinsă. Acest lucru nu poate fi decât presupus, întrucât numărul de puncte de eșantionare nu este suficient pentru a dovedi acest lucru.

$$\text{minimizat } BCF_{SS} = \frac{C_{p-minSS}}{C_{a-minSS}} \qquad \text{[Ecuația A6.2]}$$

Unde

$C_{p\text{-}minSS}$ = Concentrația în pește la starea staționară presupusă la sfârșitul absorbției (mg kg^{-1} greutate umedă).

$C_{a\text{-}minSS}$ = Concentrația în apă la starea staționară presupusă la sfârșitul absorbției (mg l^{-1}).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Apendicele 7

SECȚIUNEA DE ECUAȚII PENTRU TESTUL DE EXPUNERE PRIN ALIMENTAȚIE

1. Exemplu de cantități constitutive ale unui furaj pentru pești comercial adecvat

2. Exemple de tehnici de îmbogățire a alimentelor

3. Calcularea eficacității asimilării și a factorului de bioamplificare

4. Corecție lipidică

5. Evaluarea diferențelor dintre concentrația la momentul (C0,m) și concentrația determinată la momentul zero (*C0,d)*

6. Orientări pentru substanțele de testat cu eliminare foarte rapidă

1. EXEMPLU DE CANTITĂȚI CONSTITUTIVE ALE UNEI HRANE COMERCIALE PENTRU PEȘTI ADECVATE

Component principal	Făină de pește
Proteină brută	≤ 55,0 %
Grăsimi brute	≤ 15,0 % ([1])
Fibră brută	≥ 2,0 %
Umiditate	≥ 12 %
Cenușă	≥ 8 %

([1]) În unele regiuni, se poate obține numai furaj pentru pești cu o concentrație lipidică care este departe de această limită superioară. În astfel de cazuri, studiile se desfășoară cu cea mai scăzută concentrație lipidică în hrana astfel cum a fost furnizată și rata de alimentare se ajustează în mod corespunzător pentru a menține sănătatea peștilor. Lipidele alimentare nu se măresc artificial prin adăugarea unui exces de ulei.

2. EXEMPLE DE TEHNICI DE ÎMBOGĂȚIRE A ALIMENTELOR

Generalități

Hrana martor se pregătește în exact același mod ca hrana îmbogățită, dar cu absența substanței de testat.

Pentru a verifica concentrația din hrană tratată, se extrag eșantioane în trei exemplare din alimentele dozate cu o metodă de extracție adecvată și se măsoară concentrația substanței de testat sau radioactivitatea în extrase. Se demonstrează recuperările analitice ridicate (> 85 %) cu diferențe nesemnificative între eșantioane (trei eșantioane de concentrații pentru substanță prelevate la începutul testului nu trebuie să varieze cu mai mult de ± 15 % de la valoarea medie).

În timpul testului alimentar, se colectează trei eșantioane pentru analiză în ziua 0 și la finalul fazei de absorbție pentru determinarea conținutului de substanță de testat în hrană.

Pregătirea hranei pentru pește cu un material de testat lichid (pur)

Se setează un obiectiv privind concentrația nominală de testare în hrana pentru pești tratată, de exemplu 500 µg substanță de testat/g de produs alimentar. Se adaugă cantitatea adecvată (în masa molară sau radioactivitatea specifică) din substanța de testat pură la o masă cunoscută de hrană pentru pești într-un borcan din sticlă sau într-un balon de evaporator rotativ. Masa hranei pentru pești trebuie să fie suficientă pentru durata fazei de absorbție (luând în considerare necesitatea unor cantități din ce în ce mai mari de hrană la fiecare hrănire din cauza creșterii peștilor). Hrana peștilor/substanța de testat

▼M7

se amestecă peste noapte prin rotație lentă (de exemplu, cu ajutorul unui mixer rotativ sau prin rotație în cazul în care se utilizează un balon de evaporator rotativ). Alimentele îmbogățite se păstrează în condiții care mențin stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană (de exemplu, refrigerare) până la utilizare.

Pregătirea hranei pentru pește cu un vehicul de ulei de porumb sau de pește

Substanțele de testat în stare solidă se macină într-un mojar într-o pulbere fină. Substanțele de testat lichide se pot adăuga direct în uleiul de porumb sau de pește. Se dizolvă substanța de testat într-o cantitate cunoscută de ulei de porumb sau de pește (de exemplu de 5-15 ml). Se transferă cantitativ uleiul dozat într-un balon de evaporare de tip rotativ de dimensiuni adecvate. Flaconul utilizat la prepararea uleiului dozat se spală cu două părți mici de ulei și acestea se adaugă în balon pentru a se asigura că se transferă toată substanța de testat dizolvată. Pentru a asigura dizolvarea completă/dispersia în ulei (sau în cazul în care mai mult de o substanță de testat este utilizată în cadrul studiului) se adaugă un micro-agitator, se filetează flaconul și amestecul se agită rapid peste noapte. Se adaugă o cantitate adecvată de hrană pentru pești (de regulă sub formă de peletă) pentru test în balon și se amestecă conținutul balonului în mod omogen prin rotirea continuă a balonului de sticlă pentru cel puțin 30 de minute, dar de preferință peste noapte. Ulterior, se depozitează în mod corespunzător hrana îmbogățită (de exemplu, se refrigerează) pentru a asigura stabilitatea substanței de testat în alimente până la utilizare.

Pregătirea hranei pentru pește cu un solvent organic

Se dizolvă o cantitate adecvată de substanță de testat (în masă molară sau radioactivitate specifică) suficientă pentru a atinge doza țintă într-un solvent organic adecvat (de exemplu, ciclohexan sau acetonă; 10-40 ml, dar un volum mai mare, dacă este necesar, în funcție de cantitatea de hrană pentru îmbogățit). Se amestecă fie o parte sau toate părțile (adăugate porție după porție) din această soluție cu masa corespunzătoare de hrană pentru pești suficientă pentru ca testul să atingă nivelul de doză nominal necesar. Hrana/substanța de testat se poate amesteca într-un vas de amestecare din oțel inoxidabil și hrana pentru pești proaspăt dozată din vas se lasă într-o hotă de laborator timp de două zile (se agită ocazional) pentru a permite evaporarea solventului în exces sau se amestecă într-un balon de evaporator rotativ cu rotație continuă. Solventul în exces poate fi „suflat” sub un curent de aer sau de azot, dacă este necesar. Se acordă atenție deosebită pentru a asigura că substanța de testat nu se cristalizează pe măsură ce se îndepărtează solventul. Hrana îmbogățită se depozitează în condiții (de exemplu, refrigerare) care să mențină stabilitatea substanței de testat în amestecul de hrană până la utilizare.

3. CALCULAREA EFICACITĂȚII ASIMILĂRII ȘI A FACTORULUI DE BIOAMPLIFICARE

Pentru calcularea eficacității asimilării, se estimează mai întâi constanta vitezei de eliminare totală în conformitate cu punctul 4 din apendicele 5 (utilizând „metoda secvențială”, și anume, regresia liniară standard) utilizând concentrațiile medii ale eșantioanelor din faza de eliminare. Constanta de viteză de hrănire, I, și durata de absorbție t sunt parametrii cunoscuți ai studiului. $C_{\text{hrană}}$, concentrația medie măsurată a substanței de testat în hrană este o variabilă măsurată în studiu. $C_{0,\text{d}}$, concentrația substanței de testat în pește la sfârșitul fazei de absorbție, este derivată, de regulă, din ordonata la origine a graficului a ln(concentrației) în funcție de ziua de eliminare.

Eficacitatea asimilării substanței (a, absorbția de-a lungul intestinului) se calculează după cum urmează:

$$\alpha = \frac{C_{0,e} \cdot k_2}{I \cdot C_{hrană}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Ecuația A7.1]}$$

unde:

$C_{0,e}$ = concentrația derivată în pește la timpul zero al fazei de eliminare (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = constanta de viteză de eliminare totală (nu corectată pentru creștere) calculată în conformitate cu ecuațiile din apendicele 5, punctul 3;

I = constanta de viteză de ingestie alimentară (g aliment g^{-1} pește $ziua^{-1}$);

$C_{hrană}$ = concentrația în hrană (mg kg^{-1} aliment);

t = durata perioadei de alimentație (zi)

Cu toate acestea, constanta de viteză de alimentație, I, utilizată în calcul ar putea necesita ajustare pentru creșterea peștilor, pentru a furniza o eficacitate de asimilare exactă, a. În cadrul unui test în care peștii cresc în mod semnificativ pe durata fazei de absorbție (în care nu se efectuează nicio corecție a cantităților de hrană pentru a menține rata de alimentare stabilită), rata de alimentare efectivă pe măsură ce avansează faza de absorbție va fi mai mică decât cea stabilită, având ca rezultat o eficacitate de asimilare „reală” mai ridicată. (Se remarcă faptul că acest lucru nu este important pentru calculul total al BMF, întrucât termenii I se anulează efectiv între ecuația A7.1 și ecuația A7.4). Rată de alimentare medie corectată pentru diluția de creștere, I_c, poate fi obținută în mai multe moduri, dar un mod simplu și riguros este utilizarea constantei de creștere cunoscută (k_c) pentru a estima greutatea peștilor de testat la intervale stabilite în cursul fazei de absorbție, și anume:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Ecuația A7.2]}$$

unde

W_p (t) = greutatea medie a peștelui în ziua t de absorbție

$W_{p,0}$ = greutatea medie a peștelui la începutul experimentului

În acest mod se poate estima (cel puțin) greutatea medie a peștelui în ultima zi de expunere ($W_{p,sfârșit\ de\ absorbție}$). Având în vedere faptul că rata de alimentare a fost stabilită pe baza $W_{p,0}$, se poate calcula rata de alimentare efectivă pentru fiecare zi de absorbție utilizând aceste două valori ale greutății. Se poate calcula ulterior rata de alimentare corectată pentru creștere, I_c (g aliment g^{-1} pește zi^{-1}) pentru a fi utilizată în locul I în cazuri de creștere rapidă în cursul fazei de absorbție, ca

$$I_c = \frac{I \times W_{p,0}}{W_{p,sfârșit\ de\ absorție}} \qquad \text{[Ecuația A7.3]}$$

Odată ce s-a obținut eficacitatea asimilării, se poate calcula BMF prin înmulțirea acesteia cu constanta de viteză de alimentare I (sau I_c, în cazul în care este utilizată pentru a calcula α) și prin împărțirea acestui rezultat la constanta de viteză de eliminare totală k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2c}} \qquad \text{[Ecuația A7.4]}$$

Se calculează, de asemenea, factorul de bioamplificare corectat pentru creștere în același mod, utilizând constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (astfel cum a fost obținută la punctul 7 din apendicele 5). Din nou, în cazul în care s-a utilizat I_c pentru a calcula α, se utilizează, de asemenea, aici, în locul I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2c}} \qquad \text{[Ecuația A7.5]}$$

unde:

α = eficacitatea asimilării (absorbția substanței de testat de-a lungul intestinului);

k_2 = constanta de viteză de eliminare totală (nu corectată pentru creștere) calculată în conformitate cu ecuațiile din apendicele 5, punctul 3;

▼M7

k_{2c} = constanta de viteză de eliminare corectată pentru creștere (ziua^{-1});

I = constanta de viteză de ingestie alimentară (g aliment g^{-1} pește ziua^{-1});

Timpul de înjumătățire corectat pentru creștere ($t_{1/2}$) se calculează după cum urmează:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2c}} \qquad \text{[Ecuația A7.6]}$$

Se poate estima, de asemenea, eficacitatea asimilării substanței din alimentație în cazul în care reziduurile tisulare sunt determinate în timpul fazei liniare ale fazei de absorbție (între zilele 1 și 3). În acest caz, se poate determina eficacitatea asimilării substanței (α) după cum urmează:

$$\alpha = \frac{C_{peste}(t)}{I \times C_{hrană} \times t} \qquad \text{[Ecuația A7.7]}$$

Unde

$C_{\text{pește}}$ *(t)* = concentrația substanței de testat în pește la momentul t (mg kg^{-1} greutate umedă).

4. CORECȚIE LIPIDICĂ

În cazul în care conținutul lipidic a fost măsurat pe același pește precum analiza chimică pentru toate intervalele de eșantionare, atunci concentrațiile individuale se corectează pe o bază de lipide și se reprezintă grafic ln(concentrație, corectată lipidic) în funcție de eliminare (zi) pentru a furniza $C_{0,d}$ și k_2. Se poate calcula ulterior eficacitatea asimilării (ecuația A7.1) pe o bază de lipide, utilizând $C_{\text{hrană}}$ pe o bază de lipide (și anume, se înmulțește $C_{\text{hrană}}$ cu raportul lipidic mediu din hrană). Calcularea ulterioară utilizând ecuația A7.4 și ecuația A7.5 va furniza BMF corectat lipidic (și corectat pentru diluția de creștere) în mod direct.

În caz contrar, se determină raportul lipidic mediu (g/g) în pești și în alimente pentru grupurile de tratament și martor (pentru hrană și grupul martor această valoare se obține, de regulă, din datele măsurate la începutul și finalul expunerii; pentru grupul de pești de tratament, această valoare se obține, de regulă, din datele măsurate numai la finalul expunerii). În unele studii, conținutul lipidic al peștelui poate să crească semnificativ; în astfel de cazuri, este mai oportun să se utilizeze concentrația lipidică medie a peștilor de testat calculată pornind de la valorile măsurate la sfârșitul expunerii și la sfârșitul eliminării. În general, datele provenite numai de la grupul de tratament se utilizează pentru a obține ambele raporturi lipidice.

Factorul de corecție lipidică (L_c) se calculează după cum urmează:

$$L_C = \frac{L_{peste}}{L_{hrană}} \qquad \text{[Ecuația A7.8]}$$

unde $L_{\text{pește}}$ și $L_{\text{hrană}}$ sunt raporturile lipidice medii în pește și respectiv, în hrană.

Factorul de corecție lipidică este utilizat pentru a calcula factorul de bioamplificare corectat lipidic (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Ecuația A7.9]}$$

5. EVALUAREA DIFERENȚELOR DINTRE CONCENTRAȚIA MĂSURATĂ LA MOMENTUL ZERO ($C_{0,M}$) ȘI CONCENTRAȚIA DETERMINATĂ LA MOMENTUL ZERO ($C_{0,D}$)

Se compară concentrația măsurată la momentul zero ($C_{0,m}$) și concentrația determinată la momentul zero ($C_{0,d}$). În cazul în care acestea sunt foarte similare, acest lucru sprijină modelul de ordin întâi utilizat pentru determinarea parametrilor de eliminare.

▼M7

În unele studii, poate exista o diferență considerabilă între concentrația determinată la momentul zero $C_{0,m}$ și concentrația măsurată la momentul zero. $C_{0,m}$ (a se vedea ultima liniuță de la punctul 159 din prezenta metodă de testare). În cazul în care $C_{0,d}$ este în mod semnificativ mai scăzută decât $C_{0,m}$ ($C_{0,d}$<<$C_{0,m}$), diferența poate indică prezența unor produse alimentare îmbogățite nedigerate în intestin. Acest lucru poate fi testat în mod experimental, prin efectuarea unei analize separate pe intestinul excizat în cazul în care au fost prelevate și depozitate eșantioane suplimentare (pește întreg) la finalul fazei de absorbție. În caz contrar, dacă un test pentru detectarea valorilor aberante valid din punct de vedere statistic aplicat regresiei liniare a fazei de eliminare indică faptul că primul punct de eșantionare al eliminării este ridicat în mod eronat, ar putea fi adecvată efectuarea regresiei liniare pentru a determina k_2, dar omițând prima concentrație de eliminare. În astfel de cazuri, dacă incertitudinea în ceea ce privește regresia liniară este foarte scăzută și este clar că au fost respectate cineticile de aproximativ ordinul întâi de eliminare, poate fi adecvată utilizarea valorilor rezultate $C_{0,d}$ și k_2 la calcularea eficacității de asimilare. Acest lucru se justifică în totalitate în raport. Este posibil, de asemenea, ca în faza de eliminare să nu fi operat cinetica de ordinul întâi. În cazul în care acest lucru este posibil (și anume, datele logaritmului natural transformat par să urmeze o curbă comparată cu graficul liniei drepte a regresiei liniare), atunci calculele pentru k_2 și $C_{0,d}$ sunt puțin probabil să fie valabile și se solicită consiliere din partea unui biostatician.

În cazul în care $C_{0,d}$ este mult mai mare decât valoarea măsurată ($C_{0,d}$>>$C_{0,m}$), acest lucru poate indica: faptul că substanța a fost eliminată foarte rapid (și anume, punctele de eșantionare s-au apropiat de limita de cuantificare a metodei analitice foarte devreme în faza de eliminare, a se vedea punctul 6 de mai jos); faptul că a existat o abatere de la cinetică de ordinul întâi; faptul că regresia liniară pentru a determina k_2 și $C_{0,d}$ este eronată; sau faptul că a existat o problemă cu concentrația măsurată în studiu la unele puncte de eșantionare. În astfel de cazuri, se verifică reprezentarea regresiei liniare pentru dovezi de eșantioane la nivelul sau aproape de limita de cuantificare, pentru valori aberante și pentru curbură evidentă (sugerând altă cinetică decât de ordinul întâi) și se evidențiază în raport. Se descrie și se justifică orice reevaluare ulterioară a regresiei liniare pentru a îmbunătăți valorile estimate. În cazul în care este observă abateri semnificative de la cinetica de ordin întâi, atunci calculele pentru k_2 și $C_{0,d}$ sunt puțin probabil să fie valabile și se solicită sfatul unui biostatistician.

6. ORIENTĂRI PENTRU SUBSTANȚELE DE TESTAT CU ELIMINARE FOARTE RAPIDĂ

Astfel cum s-a discutat la punctul 129 din metoda de testare, unele substanțe se pot elimina atât de rapid încât nu se poate determina o concentrație fiabilă la momentul zero $C_{0,d}$, și k_2 deoarece în eșantioanele prelevate foarte devreme în faza de eliminare (și anume, începând de la al doilea eșantion de eliminare) substanța nu mai este măsurată în mod efectiv (concentrații raportate la limita de cuantificare). Această situație a fost observată în testul interlaboratoare efectuat în sprijinul acestei metode de testare cu benzo[a]piren și a fost documentată în raportul de validare pentru metodă. În astfel de cazuri, o regresie liniară nu poate fi efectuată în mod fiabil și este susceptibilă să furnizeze o estimare nerealistic de mare a $C_{0,d}$, având ca rezultat o eficacitate de asimilare aparentă mult mai mare de 1. Este posibil să se calculeze o estimare conservatoare a k_2 și un BMF de limită superioară în astfel de cazuri.

Utilizarea punctelor de date respective din faza de eliminare în cazul în care a fost măsurată o concentrare până și inclusiv la prima concentrație „nedetectată” (concentrația stabilită la limita de cuantificare), o regresie liniară (utilizând logaritmul natural transformat de date de concentrație în funcție de timp) va furniza o estimare a k_2. Pentru astfel de cazuri, acest lucru este posibil să implice numai două puncte de date (de exemplu, eșantionarea zilelor 1și 2 de eliminare) și ulterior se poate estima k_2 utilizând ecuația A 5.22 din apendicele 5. Această estimare k_2 poate fi utilizată pentru a estima o eficacitate de asimilare în conformitate cu ecuația A7.1, înlocuind valoarea $C_{0,d}$ în ecuație cu concentrația măsurată la momentul zero ($C_{0,m}$) în

▼**M7**

cazurile în care $C_{0,d}$ este în mod clar estimată a fi mult mai mare decât ar fi putut fi atinsă în cadrul testului. În cazul în care $C_{0,m}$ nu a fost măsurabilă, se utilizează limita de detecție în țesuturile peștilor. În cazul în care, în anumite cazuri, acest lucru furnizează o valoare $\alpha > 1$, atunci se presupune că eficacitatea asimilării ca 1 este „cel mai rău caz”.

Se poate estima ulterior BMF_K maxim utilizând ecuația A7.4 și se desemnează ca o valoare „mult mai mică decât” (<<). De exemplu, pentru un studiu efectuat cu o rată de alimentare de 3 % și un timp de înjumătățire al eliminării mai mic de 3 zile și α în „cel mai rău caz” de 1, BMF_K este probabil sub aproximativ 0,13. Având în vedere scopul acestei estimări, precum și faptul că valorile vor fi conservatoare în natură, nu este necesară corecția acestora pentru diluția de creștere sau conținut lipidic în pește sau hrană.

▼M7

Apendicele 8

ABORDĂRI PENTRU A ESTIMA POSIBILI BCF DIN DATELE COLECTATE ÎN STUDIUL DE EXPUNERE PRIN ALIMENTAȚIE

Metoda alimentară este inclusă în prezenta metodă de testare pentru testarea bioacumulării substanțelor care nu pot fi testate în practică utilizând metoda expunerii prin apă. Metoda expunerii prin apă furnizează un factor de bioconcentrare, în timp ce metoda alimentară conduce direct la informații privind potențialul de bioamplificare prin alimentație. În numeroase regimuri de securitate chimică sunt necesare informații privind bioconcentrarea acvatică (de exemplu, pentru evaluarea riscurilor și Sistemul global armonizat de clasificare). Prin urmare, este necesar să se utilizeze datele generate în cadrul unui studiu alimentar pentru a estima un factor de bioconcentrare comparabil cu testele efectuate în conformitate cu metoda expunerii prin apă ([1]). Această secțiune analizează abordări care pot fi urmate în acest scop, recunoscând, în același timp, deficiențele care sunt inerente estimărilor.

Studiile aportului alimentar măsoară eliminarea pentru a furniza o constantă de viteză de eliminare, k_2. În cazul în care o constantă de viteză de absorbție poate fi estimată pe baza datelor disponibile pentru situația în care peștii au fost expuși la substanța de testat prin apă, atunci se poate estima un BCF.

Estimarea unei constante de viteză de absorbție pentru expunerea în apă a unei substanțe de testat se bazează pe numeroase ipoteze, care vor contribui toate la incertitudinea estimării. În plus, această abordare de a estima un BCF presupune că rata de eliminare totală (inclusiv factorii care contribuie, precum distribuția în corp și procesele de eliminare individuale) să fie independentă de tehnica de expunere utilizată pentru a produce un conținut corporal de substanță de testat.

Principalele ipoteze inerente abordării de estimare pot fi rezumate după cum urmează.

Eliminarea în urma absorbției alimentare este aceeași cu eliminarea în urma expunerii prin apă pentru o anumită substanță

Absorbția din apă ar urmări cinetica de ordin întâi

În funcție de metoda utilizată pentru a estima absorbția:

— absorbția poate fi corelată numai cu greutatea peștelui

— absorbția poate fi corelată numai cu coeficientul de partiție octanol-apă al substanței

— absorbția poate fi corelată cu o combinație a greutății peștelui și a coeficientului de partiție octanol-apă al substanței

— factorii care pot afecta absorbția într-un studiu de expunere prin apă în practică precum biodisponibilitatea substanței, adsorbția în aparate, dimensiunea moleculară, etc. au un efect redus

— și, esențial:

Baza de date („setul de formare”) utilizat pentru elaborarea metodei de estimare a absorbției este reprezentativă pentru substanța luată în considerare

O serie de publicații din literatura de specialitate accesibilă au determinat ecuații care leagă absorbția din apă în pești prin branhii cu un coeficient de partiție octanol/apă al substanței, greutatea peștelui (1) (2) (3) (4), volumul și/sau conținutul lipidic, permeabilitatea/difuzia membranei (5) (6), volumul de ventilație al peștelui (7) și o abordare a fugacității/echilibrului masic (8) (9)

([1]) În sălbăticie, calea care conduce la cea mai mare expunere în mediile apoase este probabil prin ingestie pentru substanțele foarte hidrofobe și, prin urmare, un BCF estimat nu este strict reprezentativ pentru potențialul de bioacumulare al unei astfel de substanțe.

▼M7

(10). O evaluare detaliată a unor astfel de metode în acest context este furnizată în Crookes & Brooke (11). O publicație a lui Barber (12) axată pe modelarea bioacumulării prin absorbția alimentară este utilă, de asemenea, în acest context, deoarece include modele de rate de absorbție prin branhii. O secțiune din documentul de fundamentare al protocolului alimentar din 2004 (13) a fost consacrată, de asemenea, acestui aspect.

Cele mai multe dintre aceste modele par să fi fost obținute utilizând baze de date reduse. Pentru modelele pentru care sunt disponibile detalii cu privire la baza de date utilizată pentru a construi modelul, reiese faptul că tipurile de substanțe utilizate adesea sunt de o structură sau clasa similară (în termeni de funcționalitate, de exemplu, organoclorurate). Aceasta se adaugă la incertitudinea utilizării unui model pentru a estima o constantă de viteză de absorbție pentru un alt tip de substanță, în plus față de considerațiile specifice testului precum speciile, temperatura etc.

O revizuire a tehnicilor disponibile (11) a subliniat faptul că nicio metodă nu este „mai corectă” decât celelalte. Prin urmare, ar trebui să se furnizeze o justificare clară pentru modelul utilizat. În cazul în care există mai multe metode ale căror utilizare poate fi justificată, poate fi prudent să se prezinte mai multe estimări ale k_1 (și, prin urmare, BCF) sau o plajă de valori pentru k_1 (și BCF) în conformitate cu mai multe metode de estimare a absorbției. Cu toate acestea, având în vedere diferențele în ceea ce privește tipurile de modele și seturile de date utilizate pentru la elabora acestora, calcularea unei valori medii din estimările determinate în moduri diferite nu ar fi adecvată.

Unii cercetători au afirmat că estimările BCF de acest tip necesită o corecție de biodisponibilitate pentru a ține seama de adsorbția unei substanțe la carbonul organic dizolvat (COD) în condiții de expunere prin apă, pentru a aduce estimările în concordanță cu rezultatele obținute în urma studiilor de expunere prin apă [de exemplu, (13), (14)]. Cu toate acestea, această corecție ar putea să nu fie adecvată, având în vedere nivelurile scăzute de COD necesare într-un studiu de expunere prin apă pentru o estimare „în cel mai rău caz” (și anume, raportul dintre o substanță biodisponibilă la substanța astfel cum este măsurată în soluție). În cazul substanțelor foarte hidrofobe, absorbția la nivelul branhiilor poate deveni limitată de rata de difuzie pasivă în apropierea suprafeței branhiilor; în acest caz este posibil ca corecția să fie răspunzătoare pentru acest efect mai degrabă decât pentru scopul în care a fost concepută.

Se recomandă concentrarea pe metode care necesită intrări pentru care datele vor fi disponibile cu ușurință pentru substanțele testate în conformitate cu studiul aportului alimentar descris aici (și anume, K_{OW}, greutatea peștelui). Se pot aplica alte metode care necesită intrări mai complexe, dar ar putea fi necesare măsurători suplimentare în cadrul testului sau cunoștințe detaliate privind substanța de testat sau speciile de pești, care pot să nu fie disponibile pe scară largă. În plus, alegerea modelului poate fi influențată de nivelul de validare și domeniul de aplicabilitate [a se vedea (11) pentru o revizuire și o comparație a diferitelor metode].

Trebuie să se țină cont de faptul că estimarea k_1 rezultată și BCF estimat sunt incerți și ar putea fi necesar să fie tratați într-o abordare pe baza forței probante a datelor împreună cu BMF determinat și parametrii substanței (de exemplu, dimensiunea moleculară) pentru o imagine de ansamblu a potențialului de bioacumulare al unei substanțe. Interpretarea și utilizarea acestor parametri poate depinde de cadrul de reglementare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 13991420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. TESTUL DE CREȘTERE A PUIETULUI DE PEȘTE

1. METODĂ

Metoda de testare a influenței toxicității asupra creșterii reproduce Orientarea 215 (2000) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Acest test urmărește să evalueze efectele expunerii prelungite la produse chimice asupra creșterii puietului de pește. Are la bază o metodă, elaborată și intercalibrată (1) (2) în Uniunea Europeană, de evaluare a efectelor produselor chimice asupra puietului de păstrăv-curcubeu (*Oncorynchus mykiss*) în regim dinamic. Pot fi folosite și alte specii, dacă au fost bine studiate. De exemplu, s-a câștigat experiență din testele de creștere cu peștele-zebră (*Danio rerio*) ([1]) (3) (4) și medaka (*Oryzias latipes*) (5) (6) (7).

A se vedea și Introducerea generală partea C.

1.2. DEFINIȚII

Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO): este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la $p < 0,05$) în comparație cu lotul martor. Toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

Concentrația fără efecte observabile (CFEO): este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

$\mathbf{CE_x}$: în această metodă de testare este concentrația substanței testate care provoacă o variație de x % în rata de creștere a peștelui în comparație cu lotul martor.

Rata de încărcare: este greutatea peștelui pe unitatea de volum de apă.

Densitatea populației: este numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Rata de creștere specifică individuală: exprimă rata de creștere a unui individ, prin raportare la greutatea sa inițială.

Rata de creștere specifică medie a bazinului: exprimă rata de creștere medie a populației din bazin la o concentrație dată.

Rata de creștere pseudospecifică: exprimă rata de creștere individuală raportată la greutatea inițială medie a populației din bazin.

([1]) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, p. 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Puietul piscicol aflat în faza de creștere exponențială este pus, după ce este cântărit, în incintele experimentale și expus la o gamă de concentrații subletale din substanța testată, dizolvată în apă, de preferință în regim dinamic sau, dacă nu este posibil, în condiții semistatice adecvate (regim de curgere discontinuă) Durata testului este de 28 de zile. Peștii sunt hrăniți zilnic. Rația alimentară este în funcție de greutățile corporale inițiale și poate fi recalculată după 14 zile. La sfârșitul testului, peștii sunt cântăriți din nou. Efectele asupra ratelor de creștere sunt analizate folosind un model de regresie, pentru a estima acea concentrație care ar avea ca efect o variație a ratei de creștere de x %, adică a CE_x (de exemplu CE_{10}, CE_{20} sau CE_{30}). O altă variantă este ca datele să fie comparate cu valorile lotului martor, în scopul de a determina concentrația minimă cu efecte observabile (CMEO) și, de aici, concentrația fără efecte observabile (CFEO).

1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTARE

Trebuie să fie disponibile rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea metoda de testare C.1), de preferință efectuat cu speciile alese pentru acest test. Aceasta înseamnă că se cunosc solubilitatea în apă și presiunea de vapori ale substanței testate, precum și că există o metodă analitică fiabilă și disponibilă pentru cuantificarea substanței în soluții, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și specificate în raport.

Informațiile utile cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea în apă și la lumină, pKa, P_{ow} și rezultatele testului de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— mortalitatea în lotul (loturile) martor nu trebuie să depășească 10 % la sfârșitul testului;

— greutatea medie a peștilor în lotul (loturile) martor trebuie să fi crescut suficient pentru a permite detectarea variației minime a ratei de creștere considerată ca semnificativă. Un test de intercalibrare (2) a arătat că în cazul păstrăvului-curcubeu greutatea medie a peștelui în lotul martor trebuie să fi crescut în 28 de zile cu cel puțin jumătate (adică 50 %) din greutatea inițială; de exemplu, greutatea inițială: 1 g/pește (= 100 %), greutatea finală, după 28 de zile: ≥ 1,5 g/pește (≥ 150 %);

— concentrația de oxigen dizolvat trebuie să fi fost pe toată durata testului de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);

— temperatura apei trebuie să nu difere cu mai mult de ± 1 °C între bazine în niciun moment pe durata testului și să fie menținută într-un interval de 2 °C în intervalele de temperatură specificate pentru speciile de pești (apendicele 1).

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Aparatură**

Echipamentul obișnuit de laborator și în special următoarele:

— pH-metru și aparat de măsurare a oxigenului;

▼B

— echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

— aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu supraveghere continuă;

— bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și densitatea populației recomandate (a se vedea punctul 1.8.5 și apendicele 1);

— balanță de precizie adecvată (adică până la ± 0,5 %).

1.6.2. **Apa**

În test poate fi folosită orice apă în care specia testată prezintă o rată de supraviețuire și de creștere pe termen lung corespunzătoare. Trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Apa trebuie să aibă un pH în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui test dat trebuie să se încadreze într-un interval de ±0,5 unități de pH. Se recomandă o duritate (în $CaCO_3$) de peste 140 mg/l. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin complexare cu substanța testată), trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu: Ca, Mg, Na, K, Cl și SO_4), pesticide (de exemplu pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot face la intervale mai mari (de exemplu la fiecare șase luni). Câteva caracteristici chimice ale unei ape de diluare acceptabile sunt enumerate în apendicele 2.

1.6.3. **Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate).

În unele cazuri, folosirea solvenților sau a agenților de dispersie poate fi necesară pentru a realiza soluția de bază de concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilenglicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili (de exemplu acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra creșterii peștilor și nici efecte adverse vizibile asupra puietului.

▼B

La testele în regim dinamic este necesar un sistem care să distribuie și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare se verifică la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un test de intercalibrare (2) a demonstrat că, în cazul păstrăvului-curcubeu, o frecvență a schimbării apei de 6 litri/g de pește/zi este acceptabilă (a se vedea punctul 1.8.2.2).

La testele în regim semistatic (regim dinamic discontinuu), frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminare (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80-120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic.

1.6.4. **Alegerea speciilor**

Păstrăvul-curcubeu (*Oncorynchus mykiss*) este specia recomandată pentru acest test deoarece de această specie se leagă cea mai mare parte a experienței câștigate în testele de intercalibrare (1) (2). Cu toate acestea, pot fi folosite și alte specii, bine studiate, dar metoda experimentală s-ar putea să necesite adaptări, pentru a asigura condiții de testare adecvate. De exemplu, există experiență disponibilă și cu peștele-zebră (*Danio rerio*) (3) (4) și cu medaka (*Oryzias latipes*) (5) (6) (7). În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

1.6.5. **Îngrijirea peștilor**

Peștii de laborator trebuie aleși din aceeași populație, de preferință din aceleași icre, care a fost îngrijită pentru cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare cu acelea folosite la test. Peștii trebuie hrăniți cu o rație minimă zilnică reprezentând 2 % din greutatea corporală, de preferință 4 %, pe întreaga durată de îngrijire și testare.

După o perioadă de acomodare de 48 de ore, se înregistrează mortalitatea și se aplică următoarele criterii:

— mortalitate mai ridicată de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;

— mortalitate între 5 % și 10 % din populație: acomodare pentru încă șapte zile; dacă mortalitatea este peste 5 % în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;

— mortalitate mai scăzută de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă lotul.

Peștii nu trebuie să primească tratament pentru boală în cele două săptămâni anterioare testului sau în timpul testului.

▼B

1.7. STRUCTURAREA TESTULUI

„Structurarea testului” se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de bazine pentru fiecare nivel al concentrației și la numărul de pești pe bazin. În mod ideal, structurarea testului ia în considerare:

— obiectivul studiului;

— metoda de analiză statistică urmând a fi folosită;

— disponibilitatea și costul resurselor alocate.

Enunțul obiectivului ar trebui, dacă este posibil, să specifice puterea statistică la care se cere să fie detectată mărimea unei diferențe date (de exemplu în rata creșterii) sau, alternativ, precizia cu care se cere estimarea CE_x (de exemplu cu x = 10, 20 sau 30 și de preferință nu mai mic decât 10). În absența acestor informații, nu se poate indica în mod precis scara de desfășurare a studiului.

Este important să se accepte ideea că structurarea optimă (care folosește cel mai bine resursele) în raport cu o metodă de analiză statistică nu este în mod necesar optimă în raport cu altă metodă. Structurarea recomandată pentru estimarea CMEO/CFEO nu va fi aceeași cu cea recomandată pentru analiza prin regresie.

În cele mai multe cazuri, analiza de regresie este preferabilă analizei de varianță, din motivele discutate de Stephan și Rogers (8). Cu toate acestea, atunci când nu se găsește un model de regresie corespunzător ($r^2 < 0,9$), ar trebui să se recurgă la CFEO/CMEO.

1.7.1. **Structurarea pentru analiza de regresie**

La structurarea unui test care urmează să fie interpretat cu ajutorul analizei de regresie, considerentele importante sunt:

(a) concentrațiile cu efect (de exemplu $CE_{10,20,30}$) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie cu necesitate să fie cuprinse în test. Precizia cu care pot fi făcute estimările concentrațiilor cu efect va fi mai bună atunci când concentrația cu efect este la jumătatea intervalului de concentrații testate. În alegerea concentrațiilor adecvate pentru test este util un test preliminar de stabilire a intervalului;

(b) pentru a permite o modelare statistică satisfăcătoare, testul trebuie să includă cel puțin un bazin martor și alte cinci bazine la concentrații diferite. Unde este cazul, atunci când se folosește un agent de dispersie, se studiază, în afară de lotul testat, un lot martor dintr-un bazin conținând agentul de dispersie la concentrația maximă testată (a se vedea punctele 1.8.3 și 1.8.4);

(c) se poate folosi o serie geometrică sau una logaritmică adecvată (9) (a se vedea apendicele 3). Este de preferat seria logaritmică în definirea intervalelor între nivelurile concentrațiilor testate;

▼B

(d) dacă sunt disponibile mai mult de șase bazine, bazinele suplimentare ar trebui folosite fie la dublarea probelor, fie la distribuirea lor în intervalele de concentrații, în scopul îngustării acestora. Ambele măsuri sunt oportune în egală măsură.

1.7.2. **Structurarea pentru CFEO/CMEO folosind analiza de varianță**

Ar fi de preferat să existe bazine-dublură la fiecare concentrație, iar analiza statistică să se facă la nivelul fiecărui bazin (10). Fără bazine-dublură nu poate fi luată în considerare variabilitatea între bazine separat de variabilitatea de la un pește la altul. Cu toate acestea, experiența a arătat (11) că, în cazul examinat, variabilitatea între bazine a fost foarte scăzută comparativ cu cea din interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Prin urmare, o alternativă relativ acceptabilă este efectuarea analizei statistice la nivelul fiecărui exemplar.

În mod convențional, se folosesc cel puțin cinci concentrații dispuse în serie geometrică, cu o rație care de preferință nu depășește 3,2.

În general, atunci când testele se fac cu bazine-dublură, numărul bazinelor martor, și prin urmare cel al peștilor, reprezintă dublul numărului de bazine testate la fiecare concentrație, iar acesta din urmă este același la toate concentrațiile (12) (13) (14). Dimpotrivă, în absența bazinelor-dublură, numărul peștilor din lotul martor este egal cu numărul peștilor folosiți la fiecare concentrație.

Dacă analiza de varianță urmează să pornească de la bazin și nu de la fiecare pește [ceea ce ar presupune fie marcarea individuală a peștilor, fie folosirea ratelor de creștere pseudospecifice (a se vedea punctul 2.1.2)], apare necesitatea folosirii unui număr suficient de dubluri pentru a se putea determina deviația standard a „bazinelor cu aceeași concentrație”. Aceasta înseamnă că gradele de libertate pentru erorile din analiza de varianță trebuie să fie de minimum 5 (10). Dacă sunt dublate numai bazinele martor, există pericolul ca variabilitatea erorilor să fie falsificată, deoarece ea poate crește odată cu valoarea medie a ratei de creștere în cauză. Deoarece este probabil ca rata de creștere să scadă odată cu creșterea concentrației, se poate ajunge la o variabilitate supraestimată.

1.8. MODUL DE LUCRU

1.8.1. **Selectarea și cântărirea peștilor**

Este important ca variația în cântărirea peștilor să fie redusă la minimum la începutul testului. În apendicele 1 se dau intervalele corespunzătoare pentru mărimea diferitelor specii recomandate în acest test. Pentru întregul lot de pești folosit, limitele greutăților corporale individuale la începutul testului sunt, în mod ideal, cuprinse în intervalul de ± 10 % din media aritmetică a greutăților și, în orice caz, trebuie să nu depășească 25 %. Se recomandă cântărirea unui sub-eșantion de pești înainte de testare, pentru a estima greutatea medie.

▼B

Peștii nu trebuie hrăniți timp de 24 de ore înainte de începerea testului. Apoi sunt aleși la întâmplare. Folosind un anestezic general [de exemplu o soluție apoasă de 100 mg/l de metansulfonat de tricaină (MS 222) neutralizată prin adăugarea a două părți bicarbonat de sodiu la o parte de MS 222], peștii sunt cântăriți individual ca greutate *in vivo* zvântați, la precizia indicată în apendicele 1. Se reține peștii a căror greutate se află în intervalul dorit și apoi sunt distribuiți aleator în bazine. Trebuie înregistrată greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Folosirea anesteziculului, precum și manipularea peștilor (inclusiv zvântarea și cântărirea) pot să streseze și să rănească puietul, în special pe cel din speciile de talie mică. Prin urmare, manipularea puietului trebuie făcută cu cea mai mare grijă pentru a evita stresarea și rănirea animalelor de experiență.

Peștii sunt cântăriți din nou în a 28-a zi a testului (a se vedea punctul 1.8.6). Cu toate acestea, dacă se consideră necesar să fie recalculată rația alimentară, peștii pot fi cântăriți din nou în ziua a 14-a a testului (a se vedea punctul 1.8.2.3). Altă metodă, cum ar fi metoda fotografică, poate fi folosită pentru a determina schimbările în dimensiunile peștilor pe baza cărora se pot ajusta rațiile alimentare.

1.8.2. **Condițiile de expunere**

1.8.2.1. *Durata*

Durata testului este de 28 de zile.

1.8.2.2. *Rata de încărcare și densitatea populației*

Este important ca rata de încărcare și densitatea populației să fie adecvate pentru specia folosită (a se vedea apendicele 1). Dacă densitatea populației este prea mare, apare stresul de supraaglomerație, conducând la reducerea ratei de creștere și, posibil, la boli. Dacă densitatea este prea mică, poate apărea un comportament teritorial care de asemenea să afecteze creșterea. În orice caz, rata de încărcare trebuie să fie suficient de redusă pentru ca o concentrație de oxigen dizolvat de cel puțin 60 % VSA să poată fi menținută fără aerare. Un test de intercalibrare (2) a arătat că, pentru păstrăvul-curcubeu, o rată de încărcare de 16 păstrăvi de 3-5 g într-un volum de 40 l este acceptabilă. Frecvența recomandată de schimbare a apei pe durata testului este de 6 l/g de pește/zi.

1.8.2.3. *Hrănirea*

Peștelui i se administrează o alimentație corespunzătoare (apendicele 1) într-o cantitate suficientă pentru a induce o rată de creștere acceptabilă. Se veghează la evitarea proliferării microbilor și a turbidității apei. Pentru păstrăvul-curcubeu, o rație zilnică reprezentând 4 % din greutatea corporală satisface aceste condiții (2) (15) (16) (17). Rația zilnică poate fi împărțită în două porții egale și dată în două etape, la interval de cel puțin 5 ore. Rația se calculează pornind de la greutatea totală a peștilor din fiecare bazin. Dacă peștii sunt cântăriți din nou în ziua a 14-a, rația se recalculează în acea zi. Peștii nu sunt hrăniți timp de 24 de ore înainte de cântărire.

▼B

Alimentele neconsumate și materiile fecale trebuie îndepărtate zilnic din bazine, prin curățarea atentă a fundului fiecărui bazin folosind o țeavă aspiratoare.

1.8.2.4. *Lumina și temperatura*

Perioada în care bazinul este expus la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate speciei testate (apendicele 1).

1.8.3. **Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței testate, indiferent de structurarea testului (a se vedea punctul 1.7.2). Cunoașterea prealabilă a toxicității substanței testate (de exemplu dintr-un test de toxicitate acută și din studii de determinare a intervalelor) ajută la alegerea concentrațiilor adecvate. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluției de bază, concentrația finală a acestuia nu trebuie să depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate bazinele (a se vedea punctul 1.6.3). Recurgerea la astfel de produse trebuie totuși evitată pe cât posibil.

1.8.4. **Bazinele martor**

Numărul bazinelor martor cu apă de diluare depinde de structurarea testului (a se vedea punctele 1.7-1.7.2). Dacă se folosește agent de dispersie, trebuie cuprins în test și un număr de bazine martor cu agent de dispersie egal cu numărul bazinelor martor cu apă de diluare.

1.8.5. **Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate (a se vedea în continuare).

La testele în regim dinamic, debitele diluantului și al soluției de bază conținând substanța toxică trebuie verificate cu regularitate, de preferință zilnic, și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Atunci când concentrațiile substanței testate se așteaptă să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (adică în intervalul 80-120 %; a se vedea punctele 1.6.2 și 1.6.3), se recomandă minimal analiza celei mai ridicate și a celei mai scăzute concentrații la începutul testului, iar apoi la intervale de o săptămână. În cazul testului la care concentrația substanței testate nu se așteaptă a rămâne în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (pe baza datelor de stabilitate privind substanța testată), este necesară analizarea tuturor concentrațiilor, dar urmând același procedeu.

La testele în regim semistatic (cu schimbarea apei) unde concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală, se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei la începutul studiului și săptămânal după aceea. La testele unde concentrația substanței testate nu este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală, trebuie analizate toate concentrațiile urmând aceeași metodă ca și pentru substanțele mai stabile.

▼B

Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul ± 20 % față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate.

Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugarea lor. Centrifugarea este metoda recomandată. Cu toate acestea, dacă mediul de lucru nu se adsoarbe pe filtru, filtrarea este în egală măsură acceptabilă.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală, alcalinitatea și salinitatea se măsoară (dacă are relevanță) în bazinele martor și în bazinul cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la început, la jumătatea și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul se măsoară la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea și alcalinitatea se măsoară o dată la fiecare test. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul din bazine.

1.8.6. **Observații**

Greutatea: la sfârșitul testului toți peștii supraviețuitori trebuie cântăriți *in vivo* zvântați (*blotted dry*), fie în grupuri pe fiecare bazin, fie individual. Cântărirea în grup este preferată cântăririlor individuale, care necesită marcarea individuală a peștilor. În cazul măsurării greutății individuale în scopul determinării ratei de creștere specifice individuale, tehnica de marcare aleasă trebuie să evite stresarea animalelor (se poate folosi o metodă diferită de metoda crio-marcajului, de exemplu un fir de undiță subțire, colorat).

Peștii sunt examinați zilnic pe durata testului și se observă orice anomalii exterioare (cum ar fi hemoragia, decolorarea) și comportamente anormale. Se înregistrează cazurile de deces și se îndepărtează peștii morți cât mai repede posibil. Peștii morți nu sunt înlocuiți, rata de încărcare și densitatea populației fiind suficiente pentru a evita efectele asupra creșterii provocate de schimbarea numărului de pești din bazin. Este necesar totuși să se ajusteze rația alimentară.

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea, cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de bazine, de concentrații folosite, de pești etc. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.

▼B

Ratele de creștere nu se calculează pentru bazinele în care mortalitatea depășește 10 %. Cu toate acestea, rata mortalității trebuie indicată la toate concentrațiile folosite.

Oricare din metode este folosită la analizarea rezultatelor, conceptul central este rata r de creștere specifică între momentul t_1 și momentul t_2. Aceasta poate fi definită în câteva moduri, în funcție de prezența sau absența marcajului individual al peștilor sau în funcție de necesitatea aflării unei medii pe bazin.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

unde:

r_1 = rata de creștere specifică individuală

r_2 = rata de creștere specifică medie a bazinului

r_3 = rata de creștere pseudospecifică

w_1, w_2 = greutățile corporale ale unui anumit pește la momentele t_1 și respectiv t_2

$\log_e w_1$ = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la începutul perioadei de studiu

$\log_e w_2$ = logaritmul greutății corporale a unui anumit pește la sfârșitul perioadei de studiu

$\log_e W_1$ = media logaritmilor valorilor w_1 pentru peștii din bazin la începutul perioadei de studiu

$\log_e W_2$ = media logaritmilor valorilor w_2 pentru peștii din bazin la sfârșitul perioadei de studiu

r_1, r_2, r_3 pot fi calculate pentru perioada cuprinsă între ziua 0 și ziua 28 și acolo unde este cazul (adică atunci când s-a făcut o măsurătoare în ziua 14) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 14 și ziua 14 și ziua 28.

2.1.1. **Analiza rezultatelor prin regresie (modelarea concentrație-răspuns)**

Această metodă de analiză stabilește o relație matematică adecvată între ratele de creștere specifice și concentrație, ceea ce permite estimarea mărimii „CE_x”, adică orice valoare CE necesară. Folosind această metodă nu mai este necesar calculul mărimii r pentru fiecare pește (r_1) și în schimb analiza pornește de la valoarea medie pe bazin a lui r (r_2). Această ultimă metodă este preferabilă. În plus, este și mai adecvată în cazul speciilor de talie mică.

Pentru a studia relația concentrație-răspuns, ratele de creștere specifice medii ale bazinelor (r_2) se așează pe un grafic ca funcție de valorile concentrațiilor.

▼B

Pentru exprimarea relației dintre r_2 și concentrație trebuie ales modelul adecvat, iar alegerea trebuie susținută de o justificare pertinentă.

Dacă peștii supraviețuitori sunt în număr diferit de la un bazin la altul, atunci procesul de ajustare a modelului, fie acesta simplu sau nelinear, se ponderează pentru a lua în considerare mărimile diferite ale grupurilor.

Metoda de ajustare a modelului trebuie să facă posibilă estimarea, de exemplu, a valorii CE_{20} și a dispersiei sale (fie eroare standard, fie interval de încredere). Graficul modelului ajustat este prezentat în relație cu rezultatele, așa încât să poată fi apreciat gradul de adecvare a modelului (8) (18) (19) (20).

2.1.2. **Analiza rezultatelor pentru estimarea DMEO**

Dacă testul a cuprins bazine-dublură la toate nivelurile de concentrație, estimarea CMEO poate fi făcută pe baza analizei de varianță a ratei de creștere specifice medii a bazinului (a se vedea punctul 2.1), urmată de o metodă pertinentă [de exemplu testul Dunnett sau testul William (12) (13) (14) (21)] de comparare a r medii corespunzătoare fiecărei concentrații cu r medie din bazinele martor, pentru a identifica valoarea cea mai scăzută a concentrației pentru care diferența este semnificativă la nivelul de probabilitate de 0,05. Dacă nu sunt îndeplinite condițiile impuse pentru metodele parametrice – distribuție nenormală (de exemplu testul Shapiro-Wilk) sau varianță heterogenă (testul Barlett) – trebuie luată în considerare transformarea datelor, în scopul omogenizării varianțelor înainte de efectuarea analizei de varianță, sau efectuarea unei analize de varianță ponderate.

Dacă testul nu a cuprins bazine-dublură la fiecare concentrație, o analiză de varianță pe baza rezultatelor pe bazin va fi insensibilă sau imposibilă. În această situație, un compromis acceptabil este să se efectueze analiza pornind de la rata de creștere pseudospecifică r_3 pentru fiecare pește.

r_3 medie de la fiecare nivel de concentrație se compară cu r_3 medie din cazul bazinelor martor. CMEO poate fi identificată ca mai sus. Trebuie admis că această metodă nu ia în considerare variabilitatea între bazine în afară de ce se poate explica prin variabilitatea între pești, tratați individual, și nici nu oferă protecție în acest sens. Cu toate acestea, experiența a arătat (8) că variabilitatea între bazine a fost foarte mică în comparație cu variabilitatea în interiorul aceluiași bazin (adică între pești). Dacă analiza nu cuprinde fiecare pește, trebuie să se prezinte metoda de identificare a valorilor aberante și justificarea folosirii ei.

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice sau, la testele în regim semistatic, atunci când concentrația substanței testate scade între momentul preparării soluției și momentul schimbării apei.

2.3. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

▼B

2.3.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate, după caz.

2.3.2. **Specia testată:**

— numele științific, dacă este posibil;

— sușa, mărimea, furnizorul, eventuale tratamente prealabile etc.

2.3.3. **Condițiile de testare:**

— metoda folosită (de exemplu: regim semistatic/schimbarea apei, regim dinamic, încărcare, densitatea populației etc.);

— structurarea testului (de exemplu: număr de bazine, concentrații folosite și dubluri, număr de pești pe bazin);

— metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (se specifică agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— concentrațiile nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile lor standard în bazine și metoda prin care au fost obținute, precum și date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrația substanței testate în soluția reală;

— caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;

— calitatea apei din bazine: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații detaliate despre alimentație [de exemplu tipul alimentului (alimentelor), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

2.3.4. **Rezultatele:**

— date demonstrând că loturile din bazinele martor au îndeplinit criteriile de validitate referitoare la supraviețuire și date privind mortalitatea de la fiecare nivel de concentrație;

— tehnicile de analiză statistică folosite, statistici întemeiate pe bazine-dublură sau pe fiecare pește, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor folosite;

— date tabelare privind greutățile corporale individuale și medii din zilele 0, 14 (dacă se măsoară) și 28, valorile ratelor de creștere specifice medii ale bazinelor sau pseudospecifice (după caz) pentru perioadele dintre ziua 0 și ziua 28 sau, posibil, dintre ziua 0 și ziua 14 și dintre ziua 14 și ziua 28;

— rezultatele analizei statistice (adică analiza prin regresie sau de varianță), de preferat în formă tabelară și grafică și CMEO ($p = 0,05$) și CFEO sau CE_x cu erori standard când este posibil, după caz;

▼B

— incidența oricăror reacții neobișnuite a peștilor și orice efecte vizibile provocate de substanța testată.

3. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

2. Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

3. Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, p. 1855-1870.

4. Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, p. 157-164.

5. Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6. Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, p. 287-297.

7. Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

8. Stephan C.E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328-338.

9. Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, p. 81.

10. Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

11. Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

12. Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

13. Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 482-491.

▼B

14. Williams D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, p. 103-117.

15. Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994), A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, p. 123-133.

16. Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990), The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, p. 33-41.

17. Post, G. (1987), Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

18. Bruce, R. D. and Versteeg D.J. (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, p. 1485-1494.

19. DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989), Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

20. Norbert-King T. J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. p. 12.

21. Williams D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, p. 510-531.

▼B

Apendice 1

SPECIILE DE PEȘTI RECOMANDATE PENTRU TESTARE ȘI CONDIȚIILE DE LUCRU ADECVATE

Specia	Intervalul de temperatură recomandat (°C)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Intervalul recomandat pentru greutatea inițială a peștilor (g)	Precizia obligatorie a măsurătorilor	Rata de încărcare (g/l)	Densitatea populației (pe litru)	Alimentația	Durata testului (zile)
Specii recomandate:								
Oncorhynchus mykiss păstrăv-curcubeu	12,5 - 16,0	12-16	1-5	până la 100 mg	1,2 - 2,0	4	Hrană uscată din larve salmonide (produsă sub licență)	≥ 28
Alte specii bine studiate:								
Danio rerio Peștele-zebră	21-25	12-16	0,050 - 0,100	până la 1 mg	0,2 - 1,0	5-10	Hrană vie (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21-25	12-16	0,050 - 0,100	până la 1 mg	0,2 - 1,0	5-20	Hrană vie (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

Apendice 2

UNELE CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUARE ACCEPTABILE

SUBSTANȚA	CONCEN-TRAȚIILE
materie în particule	< 20 mg/l
carbon organic total	< 2 mg/l
amoniac neionizat	< 1 µg/l
clor rezidual	< 10 µg/l
pesticide organofosforice totale	< 50 ng/l
pesticide organoclorice totale plus bifenili policlorinați	< 50 ng/l
clor organic total	< 25 ng/l

▼B

Apendice 3

Seriile logaritmice ale concentrațiilor adecvate pentru testul de toxicitate (9)

Coloană (număr de concentrații între 100 și 10 sau între 10 și 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Dintr-o coloană poate fi aleasă o serie de cinci (sau mai multe) concentrații. Punctele de mijloc dintre concentrațiile din coloana (x) se găsesc în coloana (2x + 1). Valorile enumerate pot să reprezinte concentrații exprimate ca procente greutate pe unitatea de volum (mg/l sau µg/l). Valorile pot fi înmulțite sau împărțite cu orice putere a lui 10, după caz. Coloana 1 poate fi folosită dacă există o incertitudine semnificativă asupra nivelului de toxicitate.

▼B

C.15. PEȘTII, TESTUL DE TOXICITATE PE TERMEN SCURT ÎN STADIILE DE EMBRION ȘI DE ALEVIN

1. METODĂ

Această metodă de testare a toxicității pe termen scurt reproduce Orientarea 212 (1998) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate pe termen scurt în stadiile de embrion și de alevin ale peștilor este un test în care sunt expuse toxicității stadiile de dezvoltare între începutul stadiului de ou fertilizat și sfârșitul stadiului de alevin. În acest test nu se administrează hrană și testul trebuie să se încheie când alevinii sunt încă hrăniți din sacul vitelin.

Testul urmărește să definească efectele letale și, în măsură limitată, efectele subletale ale produselor chimice asupra stadiilor de dezvoltare ale speciilor testate. Acest test furnizează informații utile, putând (a) să formeze o punte între testele letale și subletale, (b) să fie folosit ca test preliminar fie pentru un test de toxicitate complet în stadiile de viață timpurii, fie pentru testele de toxicitate cronică și (c) să fie folosit la testarea speciilor acolo unde tehnicile de creștere a animalelor de experiență nu sunt suficient de avansate pentru a acoperi perioada de trecere de la alimentația endogenă la cea exogenă.

Trebuie știut că numai testele care acoperă toate stadiile din ciclul de viață a peștelui sunt în general în măsură să prezinte o estimare corectă a toxicității cronice la pește a produselor chimice și orice expunere care omite vreunul din stadii poate reduce sensibilitatea și astfel poate subestima toxicitatea cronică. Prin urmare, este de așteptat ca testul pe embrioni și alevini să fie mai puțin sensibil decât un test complet în stadiile de viață timpurii, în special în privința produselor chimice puternic lipofile (log P_{ow} > 4) și a celor având un mod specific de acțiune toxică. Cu toate acestea, este de așteptat ca diferențele de sensibilitate între cele două teste să fie mai mici în cazul produselor cu mod de acțiune nespecific, narcotic (1).

Înainte de publicarea acestui test, cea mai mare parte a experienței legate de testul pe embrioni și alevini s-a obținut cu peștii de râu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – nume popular peștele-zebră). Mai multe îndrumări detaliate asupra modului de lucru în cazul acestei specii sunt prezentate în apendicele 1. Aceasta nu exclude folosirea altor specii în cazul cărora există experiență acumulată (tabelele 1A și 1B)

1.2. DEFINIȚII

Concentrația minimă cu efect observabil (CMEO): este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect semnificativ (la $p < 0,05$) în comparație cu lotul martor. Cu toate acestea, toate concentrațiile mai mari decât CMEO trebuie să aibă efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la CMEO.

Concentrația fără efecte observabile (CFEO): este concentrația testată imediat sub valoarea CMEO.

▼B

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Embrionii și alevinii sunt expuși la o serie de concentrații ale substanței testate dizolvate în apă. Protocolul de testare permite alegerea între regimul semistatic și cel dinamic. Alegerea depinde de natura substanței testate. Testul începe prin așezarea ouălor fertilizate în incintele experimentale și se încheie imediat înainte ca sacul vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inaniție la loturile martor. Efectele letale și subletale sunt evaluate și comparate cu valorile din loturile martor, pentru a determina concentrația minimă cu efect observabil și, de aici, concentrația fără efect observabil. O altă metodă este analiza folosind un model de regresie în scopul de a estima concentrația care ar provoca o variație procentuală dată (adică CL/CE_x, unde x este definit ca % variație).

1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ

Ar trebui să fie disponibile rezultatele testului de toxicitate acută (a se vedea metoda C.1), de preferință efectuat pe specii alese pentru prezentul test. Rezultatele pot fi utile în alegerea intervalului adecvat de concentrații de lucru la testul în stadiile de viață timpurii. Ar trebui cunoscute solubilitatea în apă (inclusiv solubilitatea în apa folosită la test) și presiunea vaporilor substanței testate. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței în soluții testate, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute și menționate în raport.

Informațiile asupra substanței testate care sunt utile în fixarea condițiilor de lucru cuprind: formula structurală, puritatea substanței, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului, pKa, P_{ow} și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă (a se vedea metoda de testare C.4).

1.5. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca testul să fie valid, trebuie îndeplinite următoarele condiții:

— supraviețuirea globală a ouălor fertilizate în loturile martor si, unde este cazul, în incintele conținând solvent, dar fără substanță testată, trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în apendicele 2 și 3;

— concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie între 60 % și 100 % din valoarea de saturație în aer (VSA), pe toată durata testului;

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între incintele experimentale sau între zile succesive în orice moment al testului și trebuie să fie în intervalele de temperatură specificate pentru specia testată (apendicele 2 și 3).

▼B

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Incintele experimentale**

Pot fi folosite orice recipiente de sticlă sau din alt material chimic inert. Dimensiunile recipientelor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite respectarea ratei de încărcare (a se vedea punctul 1.7.1.2). Se recomandă poziționarea aleatoare a incintelor în laborator. La dispunerea incintelor, o schemă de randomizare a blocurilor de incinte, fiecare tratament fiind reprezentat în fiecare bloc, este preferabilă unei scheme de randomizare integrală a incintelor, dacă în laborator există efecte sistematice care pot fi controlate folosind gruparea incintelor. Gruparea în blocuri, dacă se folosește, trebuie să fie luată în considerare în analiza ulterioară a rezultatelor. Incintele experimentale trebuie protejate de orice perturbare nedorită.

1.6.2. **Alegerea speciilor de pești**

Speciile de pești recomandate sunt prezentate în tabelul 1A. Aceasta nu exclude folosirea altor specii (exemple sunt prezentate în tabelul 1B), dar modul de lucru trebuie adaptat pentru a asigura condiții corespunzătoare. În acest caz, justificarea alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

1.6.3. **Îngrijirea peștilor reproducători**

Detalii despre îngrijirea populației de pești reproducători în condiții satisfăcătoare se găsesc în Orientarea 210 a OCDE ([1]) și în referințele bibliografice 2, 3, 4, 5 și 6.

1.6.4. **Manipularea embrionilor și a larvelor**

Embrionii și larvele pot fi puse, în interiorul cuvei principale, în recipiente mai mici, cu laturile sau extremitățile din plasă, pentru a permite curgerea soluției prin recipient. Curgerea neturbulentă prin aceste recipiente mici poate fi indusă prin atașarea lor la un braț mobil, care deplasează vertical recipientele, dar așa încât să mențină organismele imersate; se poate folosi de asemenea un sistem sifon. Ouăle fertilizate de salmonide pot fi puse pe suporturi sau site cu ochiul suficient de mare pentru a permite larvelor să traverseze după eclozare. Folosirea pipetelor Pasteur este oportună pentru îndepărtarea embrionilor și a larvelor în testele semistatice cu schimbarea zilnică și completă a apei (a se vedea punctul 1.6.6).

Când au fost folosite recipiente, site sau plase pentru a păstra ouăle în cuva principală, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor ([2]), cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica peștii să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer și nu trebuie folosite minciocuri pentru a scoate peștii din recipientele conținând ouăle (aceste precauții nu sunt necesare în cazul speciilor mai puțin fragile, cum este crapul). Momentul transferului variază în funcție de specie și transferul nu este întotdeauna necesar. În regim semistatic se pot folosi pahare de laborator sau vase cu înălțimea redusă și, dacă este necesar, echipate cu o sită la mică distanță de fundul paharului. Dacă volumul acestor recipiente este suficient pentru a respecta cerințele de încărcare (a se vedea 1.7.1.2) nu este necesar transferul embrionilor și larvelor.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

([2]) Rezultatele acestor teste între laboratoare, precum și un corringedum tehnic la ISO 6341 oferă un CE_{50} la 24 h al dicromatului de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) cuprins în intervalul 0,6-1,7 mg/l.

▼B

1.6.5. **Apa**

Este corespunzătoare pentru test orice apă care respectă caracteristicile chimice ale unei ape de diluare enumerate în apendicele 4 și în care supraviețuirea loturilor martor din specia testată este cel puțin la fel de bună ca aceea prezentată în apendicele 2 și 3. Apa trebuie să își mențină calitatea constantă pe durata testului. pH-ul trebuie să rămână în intervalul de ± 0,5 unități. Pentru ca apa de diluare să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin complexare cu substanța testată) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie luate probe la intervale egale pentru analiză. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluare, se măsoară, de exemplu, la interval de trei luni conținutul în metale grele (de exemplu: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu: Ca, Mg, Na, K, Cl și SO_4), pesticide (de exemplu pesticide organofosforice totale și pesticide organoclorice totale), carbon organic total, solide în suspensie. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe o perioadă de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu la fiecare șase luni).

1.6.6. **Soluțiile de lucru**

Soluțiile de lucru de concentrații date se prepară prin diluarea unei soluții de bază.

Soluția de bază se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței testate în apa de diluare, folosind mijloace mecanice (de exemplu cu agitator sau ultrasunete). Pentru obținerea unei soluții de bază cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate). Folosirea solvenților sau a agenților de dispersie trebuie evitată pe cât posibil; totuși, în unele cazuri, astfel de compuși pot fi necesari pentru a produce o soluție de bază cu o concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, etanolul, metanolul, dimetilsulfoxidul, dimetilformamida și trietilenglicolul. Exemple de agenți de dispersie adecvați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Folosirea compușilor ușor biodegradabili (de exemplu acetona) și a compușilor foarte volatili trebuie să se facă atent, deoarece aceștia pot antrena proliferarea bacteriană în testele cu regim dinamic. Când se folosește un agent de dispersie, acesta trebuie, în demonstrația pe un lot martor tratat numai cu solventul, să nu provoace efecte semnificative asupra supraviețuirii și nici efecte adverse vizibile asupra stadiilor de viață timpurii.

La testele în regim semistatic, pot fi adoptate două moduri de lucru diferite: fie (i) se prepară soluții de lucru noi în recipiente curate, iar ouăle și larvele sunt transferate cu grijă în noile recipiente, într-un volum mic din vechea soluție evitând expunerea la aer fie (ii) organismele sunt păstrate în recipientele inițiale în timp ce o fracțiune (cel puțin trei sferturi) din apa de testare este schimbată. Frecvența schimbării apei depinde de stabilitatea substanței testate, dar se recomandă schimbarea zilnică. Dacă testele de stabilitate preliminare (a se vedea punctul 1.4) arată o instabilitate a concentrației substanței testate (adică în afara intervalului de 80-120 % din concentrația nominală sau sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe parcursul schimbării apei, trebuie luată în considerare folosirea unui test în regim dinamic. În oricare dintre cazuri, trebuie evitată stresarea larvelor în timpul operațiunii de schimbare a apei.

▼B

La testele în regim dinamic este necesar un sistem care să dozeze și să dilueze continuu soluția de bază a substanței testate (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura seria concentrațiilor din incintele experimentale. Debitele soluțiilor de bază și ale apei de diluare trebuie verificate la intervale definite, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin cinci volume de incintă în 24 de ore s-a dovedit adecvat (2)

1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI

Informații utile despre desfășurarea testelor pe embrioni de pește și alevini sunt disponibile în literatură, unele exemple fiind incluse în referințele bibliografice din prezentul text (7) (8) (9).

1.7.1. **Condițiile de expunere**

1.7.1.1. *Durata*

Testul este recomandabil să înceapă în următoarele 30 de minute după fertilizarea ouălor. Embrionii sunt imersați în soluția testată înainte sau cât de curând după începerea fazei de segmentare a blastodiscului și în orice caz înainte de debutul fazei de gastrulă. În cazul ouălor obținute de la furnizori comerciali, s-ar putea să nu fie posibilă începerea testului imediat după fertilizare. Deoarece amânarea începerii testului poate influența puternic sensibilitatea acestuia, testul trebuie inițiat în următoarele opt ore după fertilizare. Deoarece larvele nu sunt hrănite pe durata expunerii, testul trebuie să se încheie imediat înainte ca sacul vitelin al fiecărei larve din fiecare incintă să fi fost complet absorbit sau înainte de a apărea moartea prin inaniție la loturile martor. Durata depinde de specia folosită. Câteva durate recomandate sunt prezentate în apendicele 2 și 3.

1.7.1.2. *Încărcarea*

Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie suficient pentru a îndeplini condițiile statistice. Ele trebuie distribuite aleator între tratamente și trebuie folosite la fiecare concentrație cel puțin 30 de ouă, împărțite în loturi egale (sau cât mai uniforme numeric, deoarece poate fi dificil să se obțină loturi egale când se folosesc unele specii) în cel puțin trei incinte identice. Rata de încărcare (biomasă pe volum de soluție de lucru) trebuie să fie suficient de scăzută pentru ca o concentrație a oxigenului dizolvat de minimum 60 % VSA să se poată menține fără aerare. La testele în regim dinamic a fost recomandată (2) o rată de încărcare nedepășind 0,5 g/l în 24 de ore și nedepășind 5 g/l de soluție în orice moment.

1.7.1.3. *Lumina și temperatura*

Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2 și 3). În scopul monitorizării temperaturii, poate fi adecvată folosirea unui recipient martor suplimentar.

▼B

1.7.2. **Concentrațiile de lucru**

În mod normal, sunt necesare cinci valori de concentrații ale substanței testate, aflate în progresie geometrică cu o rație care să nu depășească 3,2. La alegerea intervalului de concentrații trebuie luată în considerare curba reprezentând CL_{50} în funcție de expunere, rezultată din studiul de toxicitate acută. Folosirea a mai puțin de cinci concentrații, de exemplu în testele la valori-limită, și un interval mai îngust se pot dovedi adecvate în unele cazuri. Trebuie justificată folosirea a mai puțin de cinci concentrații. Nu este necesară testarea concentrațiilor mai ridicate fie de CL_{50} la 96 de ore, fie mai ridicate de 100 mg/l (care valoare este mai scăzută dintre acestea) Concentrația maximă testată nu trebuie să depășească limita de solubilitate a substanței în apă.

Când se folosește un agent de dispersie la prepararea soluțiilor (a se vedea punctul 1.6.6), concentrația finală a acestuia în recipiente trebuie să nu depășească 0,1 ml/l și este de preferat să fie aceeași în toate recipientele.

1.7.3. **Loturile martor**

În paralel cu loturile tratate trebuie să fie studiate și loturile dintr-o incintă cu apă de diluare (cu dublură, dacă este cazul) și, dacă prezintă relevanță, dintr-o incintă cu agent de dispersie (cu dublură, dacă este cazul).

1.7.4. **Frecvența măsurătorilor și a determinărilor analitice**

Pe durata testului concentrațiile substanței testate se determină cu regularitate.

La testele în regim semistatic în care concentrația substanței testate este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (adică în intervalul 80-120 %; a se vedea punctele 1.4 și 1.6.6), se recomandă ca, minimal, concentrația cea mai ridicată și cea mai scăzută să fie analizate imediat după preparare și la schimbarea apei de cel puțin trei ori, la intervale egale pe durata testului (adică analizele trebuie efectuate pe o probă din aceeași soluție, o dată când este proaspăt preparată și o dată înainte de schimbarea apei).

La testele în care concentrațiile nu este de așteptat să rămână în intervalul ± 20 % față de valoarea nominală (pe baza datelor referitoare la stabilitatea substanței), trebuie analizate toate concentrațiile imediat după preparare și imediat înainte de schimbarea apei, dar urmând aceeași metodă (adică de cel puțin trei ori la intervale egale pe durata testului. Determinarea concentrațiilor substanței testate înainte de schimbarea apei este suficient să fie făcută numai la un singur recipient la fiecare concentrație. Determinările trebuie să nu fie făcute la intervale mai lungi de șapte zile. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, atunci când, în mod demonstrabil, concentrația substanței testate în soluție a fost menținută pe parcursul întregului test în intervalul ± 20 % față de concentrația nominală sau concentrația măsurată inițial, rezultatele pot fi fundamentate pe valorile nominale sau măsurate inițial.

La testele în regim dinamic este adecvat un sistem de prelevare a probelor similar cu acela prescris pentru regimul semistatic (dar măsurarea soluțiilor „vechi” nu se aplică în acest caz). Cu toate acestea, dacă durata testului este mai mare de șapte zile, este recomandabilă creșterea numărului de prelevări în prima săptămână (de exemplu trei seturi de măsurători) pentru a se asigura stabilitatea concentrațiilor.

▼B

Se poate dovedi necesară centrifugarea probelor sau filtrarea lor (de exemplu cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm). Cu toate acestea, deoarece se pare că nici centrifugarea nici filtrarea nu separă întotdeauna fracția non-biodisponibilă a substanței testate de fracțiunea biodisponibilă, se poate dovedi inutilă supunerea probelor la aceste tratamente.

În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura se măsoară în toate bazinele. Duritatea totală și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară în incintele martor și în incinta cu cea mai ridicată concentrație. Minimal, oxigenul dizolvat și salinitatea (dacă are relevanță) se măsoară de trei ori (la începutul, la jumătatea și la sfârșitul testului). În testele în regim semistatic, se recomandă ca oxigenul dizolvat să se măsoare mai frecvent, de preferință înainte și după schimbarea apei sau cel puțin o dată pe săptămână. pH-ul trebuie măsurat la începutul și la sfârșitul fiecărei schimbări a apei la testele în regim semistatic și cel puțin săptămânal la testele în regim dinamic. Duritatea trebuie măsurată o dată la fiecare test. Temperatura se măsoară zilnic și este de preferat să fie monitorizată continuu cel puțin într-una din incinte.

1.7.5. **Observații**

1.7.5.1. *Stadiul dezvoltării embrionare*

Stadiul embrionar (adică stadiul de gastrulă) la începutul expunerii la substanța testată trebuie verificat cât mai exact posibil. Aceasta se poate face folosind un eșantion reprezentativ de ouă păstrate corespunzător și curățate până devin translucide. Pentru descrierea și ilustrarea stadiilor embrionare se poate consulta și literatura (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Eclozarea și supraviețuirea*

Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să fie făcute cel puțin o dată pe zi și numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. La începutul testului este de dorit ca observațiile să fie mai frecvente (de exemplu la fiecare 30 de minute în primele trei ore), deoarece în unele cazuri timpul de supraviețuire este mai relevant decât numărul deceselor (de exemplu când există efecte toxice acute). Embrionii și larvele moarte trebuie îndepărtate imediat ce sunt observate, fiindcă se pot descompune rapid. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu răni sau leza ouăle/larvele din vecinătate, acestea fiind extrem de delicate și de sensibile. Simptomele care indică moartea organismului variază în funcție de stadiul de viață:

— **pentru ouă**: în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a translucidității și schimbarea colorației, provocată de coagularea și precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;

— **pentru embrioni**: absența mișcărilor corpului și absența bătăilor inimii și decolorarea opacă la speciile ai căror embrioni sunt în mod normal translucizi;

— **pentru larve**: imobilitatea și absența mișcărilor respiratorii și absența bătăilor inimii și coloratia alb-opacă a sistemului nervos central și absența reacției la stimuli mecanici.

▼B

1.7.5.3. *Aspectul anormal*

Numărul larvelor prezentând anomalii ale formei corpului și pigmentare, precum și stadiul absorbției sacului vitelin trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului și de natura anomaliei în cauză. Trebuie spus că embrioni și larve anormale apar în mod natural și numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile martor ale unor specii. Animalele anormale nu trebuie îndepărtate din recipiente decât atunci când mor.

1.7.5.4. *Comportamentul anormal*

Anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat și imobilitatea neobișnuită, trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului. Aceste efecte, deși dificil de cuantificat, pot, atunci când sunt ținute sub observație, să ajute la interpretarea datelor privind mortalitatea, adică pot furniza informații despre modul de acțiune toxică a substanței.

1.7.5.5. *Lungimea*

La sfârșitul testului se recomandă măsurarea lungimilor individuale; poate fi folosită oricare din lungimile standard, până la scobitura caudală sau totală. Cu toate acestea, dacă se constată o putrefacție sau o rosătură la înotătoarea caudală, se folosesc lungimile standard. În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Greutatea*

La încheierea testului poate fi măsurată greutatea corporală individuală; greutatea organismului uscat (24 de ore la 60 °C) este preferată greutății *in vivo* (pește zvântat). În general, într-un test efectuat corect, coeficientul de variație a lungimii în lotul martor este ≤ 20 %.

Aceste observații pun la dispoziția analizei statistice totalitatea datelor următoare sau unele dintre acestea:

— mortalitatea cumulată;

— numărul larvelor sănătoase la încheierea testului;

— momentele de început și sfârșit al eclozării (adică 90 % ouă eclozate în fiecare incintă de la același nivel al concentrației);

— numărul larvelor eclozate în fiecare zi;

— lungimea (și greutatea) animalelor supraviețuitoare la încheierea testului;

— numărul larvelor cu diformități sau cu aspect anormal;

— numărul larvelor prezentând comportament anormal.

▼B

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se recomandă implicarea unui statistician atât în structurarea cât și în analiza testului, deoarece această metodă de testare permite variații considerabile în modul de lucru, cum ar fi, de exemplu, variații în numărul de incinte experimentale și de concentrații folosite, în numărul inițial de ouă fertilizate și în parametrii măsurați. Luând în considerare opțiunile disponibile în structurarea testului, nu sunt prezentate aici îndrumările specifice referitoare la metoda statistică.

Dacă urmează să fie estimate CMEO/CFEO, este necesar ca variațiile să fie estimate în cadrul fiecărui set de incinte de la aceeași concentrație, folosind analiza de variație sau metodele tabelelor de contingență. Metoda Dunnett se poate dovedi folositoare (12) (13) pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și rezultatele obținute în legătură cu loturile martor. De asemenea sunt disponibile și alte exemple utile (14) (15). Mărimea efectului detectabil folosind analiza de varianță sau alte metode (adică puterea testului) trebuie calculată și menționată în raport. Trebuie spus că nu toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6 sunt adecvate pentru analiza statistică de varianță. De exemplu, mortalitatea cumulată și numărul larvelor sănătoase la încheierea testului pot fi analizate folosind metode probit.

Dacă urmează să fie estimate CL/CE_x, una sau mai multe curbe, cum ar fi curba logistică, trebuie ajustate la datele studiate folosind o metodă precum metoda celor mai mici pătrate sau metoda celor mai mici pătrate neliniare. Curba (curbele) trebuie parametrizate astfel încât CL/CE_x studiate și eroarea standard respectivă să poată fi estimate direct. Aceasta va ușura mult calculul intervalului de încredere din jurul CL/CE_x. Dacă nu sunt motive întemeiate să fie preferate alte niveluri de încredere, ar trebui alese nivelurile de 95 % la ambele capete ale intervalului. Este de preferat ca metoda de ajustare să asigure un mijloc de a evalua semnificația neajustării. Pot fi folosite metode grafice de ajustare a curbelor. Analiza prin regresie este adecvată pentru toate observațiile enumerate la punctul 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanțelor toxice ajung la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice. Rezultatele se interpretează de asemenea cu precauție în cazul concentrațiilor mai mari decât solubilitatea în apă a substanței.

2.3. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să cuprindă următoarele informații:

2.3.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante,

— datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței, după caz.

▼B

2.3.2. **Specia testată:**

— numele științific, sușa, numărul peștilor parentali (câte femele au fost folosite pentru a asigura numărul necesar de ouă), sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

2.3.3. **Condițiile de testare:**

— metoda folosită (de exemplu: regim semistatic, regim dinamic, timpul scurs de la fertilizare până la începerea testului, încărcare etc.);

— perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— structurarea testului (de exemplu: număr de incinte și de dubluri, număr de embrioni pe incintă);

— metoda de preparare a soluțiilor de bază și frecvența schimbării apei (trebuie specificat agentul de solubilizare și concentrația acestuia, dacă se folosește);

— concentrațiile de lucru nominale, valorile măsurate, mediile lor și deviațiile lor standard în recipiente și metoda prin care au fost obținute, precum și, dacă substanța testată este solubilă în apă la concentrații mai reduse decât cele testate, date care să demonstreze că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței testate în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluare: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă se măsoară), carbon organic total, solide în suspensie, salinitatea mediului de lucru (dacă se măsoară) și orice alte măsurători efectuate;

— calitatea apei din recipiente: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat.

2.3.4. **Rezultatele:**

— rezultatele oricăror studii preliminare referitoare la stabilitatea substanței testate;

— date demonstrând că loturile din incintele martor au îndeplinit standardul de supraviețuire globală acceptabilă al speciei testate (apendicele 2 și 3);

— rezultate despre mortalitate/supraviețuire în stadiile de embrion și larvă și mortalitatea/supraviețuirea globală;

— zilele de eclozare și numărul eclozărilor;

— lungimea (și greutatea) corporală;

— incidența și descrierea anomaliilor morfologice, dacă există;

— incidența și descrierea efectelor comportamentale, dacă există;

— analiza statistică și prelucrarea datelor;

— la testele analizate folosind analiza de varianță, concentrația minimă cu efecte observabile (CMEO) la $p = 0,05$ și concentrația fără efecte observabile (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat, inclusiv descrierea metodelor statistice folosite și indicarea mărimii efectului care poate fi detectat;

▼B

— la testele analizate folosind analiza prin regresie, CL/CE_x și intervalele de încredere, precum și un grafic al modelului ajustat folosit în calcule;

— explicații pentru orice abatere de la această metodă de testare.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, p. 60, June 1990.

2. ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. p. 26.

3. Brauhn J. L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4. Brungs W. A. and Jones B. R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5. Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 121-173.

6. Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, p. 328-330.

7. Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, p. 61-71.

8. Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 807-821.

9. Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, p. 129-145.

10. Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11. Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina, p. 36.

12. Dunnett C. W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

13. Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

14. Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

15. Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, p. 321-334.

16. Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, p. 81.

17. Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, p. 126-134.

18. Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: p. 231-236.

19. Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, p. 19-28.

20. US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21. US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22. De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, p. 1189-1203.

23. Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24. Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, p. 280.

25. Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, In: W. S. Hoar and D. J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, p. 1-58.

Tabelul 1a

Specii de pești recomandate pentru testare

APĂ DULCE
Oncorhynchus mykiss Păstrăv-curcubeu (9) (16)
Danio rerio Peștele-zebră (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Crap (8) (19)
Oryzias latipes Medaka (20) (21)
Pimephales promelas (8) (22)

▼B

Tabelul 1b

Exemple de alte specii de pești bine studiate care au fost folosite

APĂ DULCE	APĂ SĂRATĂ
Carassius auratus Caras auriu (8)	*Menidia peninsulae* (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengus* Herring (24) (25)
	Gadus morhua Cod (24) (25)
	Cyprinodon variegatus (23) (24) (25)

▼B

Apendicele 1

GHID PENTRU EFECTUAREA UNUI TEST DE TOXICITATE LA EMBRIONI ȘI ALEVINI DE PEȘTE-ZEBRĂ *(BRACHYDANIO RERIO)*

INTRODUCERE

Peștele zebră provine de pe coasta Coromandel din India unde trăiește în apele repezi. Este un pește obișnuit de acvariu din familia crapului și datele referitoare la creșterea și îngrijirea acestuia se pot găsi în cărțile de specialitate privind peștii tropicali. Laale descrie biologia și utilizarea acestuia în studiul privind peștii (1).

Acest pește are rareori o lungime mai mare de 45 cm. Corpul este cilindric cu 7-9 dungi argintii orizontale de culoare albastru închis. Aceste dungi ajung până la înotătoarele caudale și anale. Spatele este de culoare verde-măsliniu. Masculii sunt mai subțiri decât femelele. Femelele sunt mai argintii și abdomenul este umflat, în special înainte de depunerea icrelor.

Peștii adulți pot să suporte fluctuații mari de temperatură, pH și duritate a apei. Cu toate acestea, pentru a obține pești sănătoși care să producă icre de bună calitate, trebuie asigurate condiții optime.

În timpul depunerii icrelor, masculii urmăresc și lovesc cu capul femelele și astfel se produce fecundarea icrelor atunci când sunt expulzate. Icrele, care sunt transparente și nelipicioase, cad la fund unde pot fi mâncate de părinți. Depunerea icrelor este influențată de lumină. Dacă lumina dimineții este corespunzătoare, peștele depune icrele de obicei în primele ore din zori.

O femelă poate să producă loturi de câteva sute de icre săptămânal.

CONDIȚII PENTRU PEȘTII PĂRINȚI, REPRODUCERE ȘI PRIMELE STADII DE VIAȚĂ

Se selectează un număr potrivit de pești sănătoși care se păstrează în apă corespunzătoare (de exemplu apendicele 4) cu cel puțin două săptămâni înainte de data preconizată pentru depunerea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fie lăsat să se reproducă cel puțin o dată înaintea producerii lotului de icre utilizate în test. Densitatea peștelui în perioada respectivă nu trebuie să depășească 1 gram de pește per litru. Schimbările regulate de apă sau utilizarea sistemelor de purificare permit o densitate mai mare. Temperatura din acvarii se menține la 25 ± 2 ^{o}C. Peștelui trebuie să i se asigure o alimentație variată, care poate să conțină, de exemplu hrana uscată specifică comercializată, Arthemia, chironomide, dafnia vii proaspăt ieșiți din ou, viermi albi (Enchytraeide).

În continuare, sunt prezentate două procedee, prin care s-a obținut în practică un lot suficient de icre fecundate, sănătoase pentru efectuarea unui test:

(i) 8 femele și 16 masculi se introduc într-un acvariu cu 50 litri apă de diluție, ecranat de lumina directă și se lasă cât se poate de liniștiți timp de 48 ore. La fundul vasului se așează o tavă pentru depunerea icrelor în după-amiaza zilei de dinaintea inițierii testului. Tava pentru depunerea icrelor este alcătuită dintr-un cadru (plexiglas sau alt material potrivit) înalt de 5-7 cm, prevăzut cu o plasă cu ochiuri mari, de 2-5 mm, fixată la partea superioară și o plasă fină, cu ochiuri de 10-30 μm, la partea inferioară. La plasele cu ochiuri mari ale cadrului, se atașează un număr de „pomi pentru depunerea icrelor” dintr-o frânghie de nylon nerăsucită. După ce peștii au fost lăsați în întuneric timp de 12 ore, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. La 2-4 ore după depunerea icrelor, se scoate tava pentru depunerea icrelor și se colectează icrele. Cu tava pentru depunerea icrelor se evită mâncarea icrelor de către pești și se facilitează colectarea icrelor. Este necesar ca grupul de pești să fi depus icre cel puțin o dată înaintea depunerii din care se iau icre pentru efectuarea testului.

▼B

(ii) Un număr de 5-10 masculi și femele se adăpostesc individual cu cel puțin două săptămâni înaintea depunerii icrelor. După 5-10 zile, abdomenele femelelor se umflă și papila genitală a acestora devine vizibilă. Masculii nu au papilă. Depunerea icrelor se realizează în acvarii de depunere a icrelor prevăzute cu un fund fals din plasă (cum s-a descris anterior). Acvariul este umplut cu apă de diluție, astfel încât, deasupra plasei apa să fie de 5-10 cm. O femelă și doi masculi se introduc în acvariu cu o zi înaintea datei preconizate pentru depunerea icrelor. Temperatura apei se crește treptat la o valoare cu un grad mai mare decât temperatura de aclimatizare. Se stinge lumina și acvariul se lasă cât se poate de liniștit. Dimineață, se aprinde o lumină slabă care va iniția depunerea icrelor. După 2-4 ore, peștele se scoate și se colectează icrele. Dacă sunt necesare loturi mai mari de icre decât se pot obține de la o femelă, se pot instala, în paralel, mai multe acvarii de depunere a icrelor. Prin înregistrarea rezultatului fiecărei femele înaintea testului (dimensiunea lotului și calitatea), se selectează pentru reproducere femelele cu cele mai bune rezultate la reproducere.

Este necesar ca icrele să fie transferate în vasele pentru efectuarea testului cu ajutorul unor tuburi de sticlă (diametrul interior de minimum 4 mm) prevăzute cu un bulb de aspirație flexibil. Cantitatea de apă care se transferă odată cu icrele trebuie să fie cât mai mică posibilă. Icrele sunt mai grele decât apa și ies pe la fundul tubului. Trebuie avut grijă pentru a preveni ca icrele (și larvele) să vină în contact cu aerul. Proba (probele) din lot(uri) se examinează la microscop pentru a se asigura că nu există anomalii în primele etape de dezvoltare a embrionului. Nu este permisă dezinfecția icrelor.

Rata mortalității icrelor atinge apogeul în primele 24 de ore după fecundare. În această perioadă, se întâlnește adesea o mortalitate de 5-40 %. Icrele degenerează ca urmare a unei fecundări nereușite sau a dezvoltării insuficiente a embrionului. Calitatea lotului de icre se pare că depinde de peștele femelă, deoarece unele femele produc în mod constant icre de bună calitate, iar altele niciodată. De asemenea, rata de dezvoltare a embrionului și rata de ieșire din ou variază de la un lot la altul. Icrele fecundate cu succes și larvele din sacul vitelin supraviețuiesc bine, în mod normal peste 90 %. La 25 ^{o}C, ieșirea din ou se produce la 3-5 zile de la fertilizare și sacul vitelin se absoarbe în aproximativ 13 zile după fecundare.

Hisaoka și Battle au descris bine dezvoltarea embrionului (2). Datorită transparenței icrelor și larvelor după ieșirea din ou, se poate urmări dezvoltarea peștelui și este posibilă observarea malformațiilor. La aproximativ patru ore după depunerea icrelor, icrele nefecundate se pot distinge de cele fecundate (3). Pentru a efectua această examinare, icrele și larvele se așează pe vase de laborator de volum mic și se studiază la microscop.

Condițiile de desfășurare a testului, care se aplică în primele etape de viață, sunt prezentate în lista din apendicele 2. Valorile optime ale pH-ului și durității apei de diluție sunt 7,8 și, respectiv, 250 mg $CaCO_3$/l.

CALCULE ȘI STATISTICĂ

Se propune un procedeu în două etape. Mai întâi, se analizează statistic datele privind mortalitatea, dezvoltarea anormală și momentul ieșirii din ou. Apoi, pentru acele concentrații la care nu s-au observat efecte negative asupra oricăruia din parametrii menționați, se evaluează statistic lungimea corpului. Această abordare este recomandabilă deoarece toxicul poate să ucidă selectiv peștii mai mici, să întârzie momentul ieșirii din ou și să inducă malformații majore, obținându-se astfel măsurători viciate ale lungimii. În plus, pentru fiecare tratament, va exista același număr de pești ce urmează să se măsoare, asigurându-se validitatea statisticii testului.

▼B

DETERMINAREA CL_{50} ȘI CE_{50}

Se calculează procentul de icre și larve supraviețuitoare și se corectează cu mortalitatea din probele martor conform formulei lui Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

unde:

P = supraviețuirea corectată, %

P' = supraviețuirea observată la concentrațiile experimentate, %

C = supraviețuirea în cazul martorului, %

Dacă este posibil, CL_{50} se determină printr-o metodă corespunzătoare la sfârșitul testului.

Dacă se dorește introducerea anomaliilor morfologice în statistica CE_{50}, se poate folosi lucrarea lui Stephan (5) pentru orientare.

ESTIMAREA CMEO ȘI CFEO

Un obiectiv al testului efectuat pe icre și alevini este compararea concentrațiilor non-zero cu proba martor, adică determinarea CMEO. Pentru aceasta se utilizează multiple procedee de comparare (6) (7) (8) (9) (10).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Laale H. W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 121-173.

2. Hisaoka K. K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, p. 311.

3. Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173-181.

4. Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333.

5. Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, p. 69-81.

6. Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

7. Dunnett C. W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

8. Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103-117.

9. Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531.

10. Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

Apendicele 2

CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

Specia	Temperatura (°C)	Salinitatea (0/00)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Durata etapelor (zile)		Durata normală a testului	Supraviețuirea martorului (minimum %)	
				Embrion	Alevin		Reușita ieșirii din ou	După ieșirea din ou
Brachydanio rerio Peștele-zebră	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (8-10 zile)	80	90
Oncorhynchus mykiss Păstrăv-curcubeu	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 20 de zile după ieșirea din ou (50-55 zile)	66	70
Cyprinus carpio Crap	21-25	—	12-16	5	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (13-16 zile)	80	80
Pimephales promelas	25 ± 2	—	16	4-5	5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (8-9 zile)	60	70

(1) Pentru embrioni.
(2) Pentru larve.
(a) Întuneric pentru embrioni și larve până la o săptămână după ieșirea din ou, cu excepția cazului în care se inspectează. Apoi se dă o lumină atenuată pe durata testului.

▼B

Apendicele 3

Condițiile, durata testului și criteriile de supraviețuire pentru alte specii bine studiate

Specii	Temperatura (°C)	Salinitatea (0/00)	Perioada de expunere la lumină (ore)	Durata etapelor (zile)		Durata normală a testului	Supraviețuirea martorului (minimum %)	
				Embrion	Alevin		Reușita ieșirii din ou	După ieșirea din ou
APĂ DULCE								
Carassius auratus Caras auriu	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 zile după ieșirea din ou (7 zile)	—	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	—	16	3	> 4	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4 de zile după ieșirea din ou (7 zile)	—	75
APĂ SĂRATĂ								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1,5	10	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 5 zile după ieșirea din ou (6-7 zile)	80	60
Clupea harengus Hering	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (23-27 de zile)	60	80
Gadus morhua Cod	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 3 zile după ieșirea din ou (18 zile)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	—	—	De îndată ce este posibil după fecundare (prima fază de gastrulă) până la 4/7 zile după ieșirea din ou (28 de zile)	> 75	80

▼B

Apendicele 4

CÂTEVA CARACTERISTICI CHIMICE ALE UNEI APE DE DILUȚIE ADMISE

SUBSTANȚA	CONCENTRAȚIILE
Substanță impurificatoare	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	< 50 ng/l
Totalul pesticidelor organoclorice și a bifenililor policlorurați	< 50 ng/l
Clorul organic total	< 25 ng/l

▼B

C.16. **ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ORALĂ ACUTĂ**

1. **METODĂ**

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 213 (1998) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității orale acute a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În aprecierea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, ar putea fi necesară determinarea toxicității orale acute la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate orală acută se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv trebuie utilizate pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semi-teren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

1.2. DEFINIȚII

Toxicitatea orală acută: reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore (h) de la administrarea orală unei doze unice de substanță testată.

Doza: reprezintă cantitatea de substanță testată consumată. Doza se exprimă ca masa (μg) de substanță testată per animal experimental (μg/albină). Nu se poate calcula doza reală pentru fiecare albină, deoarece albinele sunt hrănite în colectiv, dar se poate estima o doză medie (substanța testată consumată în total/numărul de albine experimentale dintr-o cușcă).

DL_{50} (doza letală medie) orală: este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează pe cale orală. Valoarea DL_{50} se exprimă în (μg) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

Mortalitatea: un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dispersată în soluție de zaharoză. Albinele primesc apoi aceeași hrană, fără substanța testată. Mortalitatea se înregistrează zilnic timp de cel puțin 48 h și se compară cu valorile pentru proba martor. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore, în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică ≤ 10 %, este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL_{50} la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

▼B

1.4. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;

— DL_{50} a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere din același roi, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile de testare până în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progenituri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor” (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

1.5.2. **Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza orice material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de 25 ± 2 °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500 g/l (50 % g/v). După administrarea dozelor de testare, hrana se furnizează *ad libitum*. Este necesar ca sistemul de alimentare să permită înregistrarea hranei consumate în fiecare cușcă (1.6.3.1). Se poate utiliza o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

1.5.3. **Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se repartizează în mod aleatoriu în cuștile experimentale, care se aranjează în mod aleatoriu în camera experimentală.

▼B

Albinele se pot înfometa timp de până la 2 ore înaintea începerii testului. Se recomandă ca albinele să fie lipsite de hrană înaintea tratamentului, astfel încât, la începutul testului, intestinele tuturor albinelor să aibă același conținut. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

1.5.4. **Pregătirea dozelor**

Dacă substanța testată este un compus miscibil cu apa, se poate dispersa direct în soluția de zaharoză 50 %. Pentru produsele și substanțele tehnice cu solubilitate mică în apă, se pot utiliza purtători care pot să fie solvenți organici, emulgatori sau agenți de dispersie cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu acetone, dimetilformamidă, dimetilsulfoxid). Concentrația purtătorului depinde de solubilitatea substanței testate și ar trebui să fie aceeași pentru toate concentrațiile experimentate ale substanței. Cu toate acestea, în general, este potrivită o concentrație a purtătorului de 1 % care nu trebuie să fie depășită.

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței testate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: o soluție în apă și o soluție de zaharoză cu solventul/purtătorul la concentrația utilizată în soluțiile de dozare.

1.6. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.6.1. **Grupele experimentale și cele martor**

Numărul de doze și probe identice trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea DL_{50} cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru DL_{50}. Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza în funcție de mortalitate) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată. În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Sunt prevăzute serii martor și pentru solvenții/purtătorii utilizați (1.5.4).

1.6.2. **Etalonul de toxicitate**

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale DL_{50}. Pentru fiecare doză testată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dimetoatul, pentru care DL_{50} – 24 h semnalată se situează între valorile 0,10-0,35 µg s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu, parationul).

▼B

1.6.3. **Expunerea**

1.6.3.1. *Administrarea dozelor*

Fiecărei grupe de albine i se administrează 100-200 µl soluție apoasă 50 % de zaharoză, ce conține substanța testată la concentrația corespunzătoare. Pentru produsele cu solubilitate mică, toxicitate mică sau concentrație mică în preparat este necesar un volum mare, deoarece trebuie să se utilizeze proporții mai mari din soluția de zaharoză. Se monitorizează cantitatea de hrană tratată consumată per grupă. După consumarea hranei (de obicei în 3-4 h), vasul de alimentare se scoate din cușcă și se înlocuiește cu unul care conține numai soluție de zaharoză. Soluțiile de zaharoză se furnizează apoi *ad libitum*. Pentru unii compuși, la concentrații mai mari, respingerea dozei testate poate să genereze un consum mic sau inexistent de hrană. După maximum 6 h, hrana tratată neconsumată se înlocuiește numai cu soluția de zaharoză. Se evaluează cantitatea de hrană tratată consumată (de exemplu prin măsurarea raportului volum/greutate pentru hrana tratată neconsumată).

1.6.3.2. *Durata*

Durata testului este de preferință de 48 ore după ce soluția de substanță testată este înlocuită cu soluția de zaharoză singură. Dacă mortalitatea continuă să crească cu mai mult de 10 % după primele 24 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

1.6.4. **Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după începerea testului și apoi la 24 h și 48 h (adică după administrarea dozei). Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se estimează cantitatea de hrană consumată per grupă. Compararea cantităților consumate din hrana tratată și netratată în 6 ore de administrare poate furniza date referitoare la gustul plăcut al hranei tratate.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

1.6.5. **Testul la valori-limită**

În unele cazuri (de exemplu când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori-limită, utilizând 100 µg s.a./albină pentru a demonstra că DL_{50} este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți, evaluarea cantității de hrană consumată și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă apar mortalități, se efectuează un studiu complet. Dacă se observă efecte subletale (1.6.4), se consemnează.

▼B

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată și se calculează pantele curbelor și dozele letale medii (DL_{50}) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5). Dacă hrana tratată nu se consumă în întregime, se determină doza de substanță testată per grupă. DL_{50} se exprimă în μg de substanță testată per albină.

2.2. RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu stabilitatea în apă, presiunea vaporilor);

— datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) activ(e)].

2.2.2. **Speciile experimentale:**

— denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării;

— datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile etc.

2.2.3. **Condiții de testare:**

— temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală;

— condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor;

— metodele de preparare a soluțiilor mamă și experimentate (se specifică solventul și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (trebuie să se specifice agentul de solubilizare și concentrațiile acestuia, dacă se utilizează);

— protocolul testului, de exemplu numărul de încercări și concentrațiile experimentate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice și numărul de albine per cușcă;

— data efectuării testului.

▼B

2.2.4. **Rezultatele**

— rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;

— datele brute: mortalitatea la fiecare doză experimentată și fiecare moment de observare;

— trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;

— valorile DL_{50} cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;

— metodele statistice utilizate pentru determinarea DL_{50};

— mortalitatea la martori;

— alte efecte biologice observate sau măsurate, de exemplu comportamentul anormal al albinelor (inclusiv respingerea dozei cu substanța testată), rata consumului de hrană la grupele tratate și netratate;

— orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March 1993.

2. Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, p. 119-125.

3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

4. Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5. Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol.,18, p. 265-267.

▼B

C.17. ALBINELE – TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PRIN CONTACT

1. METODĂ

Metoda de determinare a toxicității acute reproduce Orientarea 214 (1998) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Prezentul test de toxicitate este o metodă de laborator, destinată determinării toxicității acute prin contact a produselor pentru protecția plantelor și a altor produse chimice la albinele lucrătoare adulte.

În evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor, s-ar putea să fie necesară determinarea toxicității acute de contact la albine, de exemplu când este posibilă expunerea albinelor la un anumit produs chimic. Testul de toxicitate acută prin contact se efectuează pentru determinarea toxicității inerente a pesticidelor și altor produse chimice la albine. Rezultatele testului respectiv se utilizează pentru a stabili necesitatea unei evaluări suplimentare. Prezenta metodă se poate utiliza în special în programele în mai multe etape pentru evaluarea pericolelor pesticidelor pentru albine, prin înaintare secvențială de la testele de toxicitate de laborator la experimentările de semi-teren și teren (1). Pesticidele se pot testa sub formă de substanțe active (s.a.) sau de preparate.

Pentru verificarea sensibilității albinelor și a preciziei metodei de testare este necesară utilizarea unui etalon de toxicitate.

1.2. DEFINIȚII

Toxicitatea orală acută: reprezintă efectele negative care apar în termen de maximum 96 ore de la aplicarea locală a unei doze unice dintr-o substanță.

Doza: reprezintă cantitatea de substanță testată aplicată. Doza se exprimă ca masa (μg) de substanță testată per animal experimental (μg/albină).

DL_{50} (doza letală medie) de contact: este o doză unică, obținută statistic, dintr-o substanță care poate provoca moartea a 50 % din animale atunci când se administrează prin contact. Valoarea DL_{50} se exprimă în (μg) de substanță testată per albină. Pentru pesticide, substanța testată poate să fie sub formă de substanță activă (s.a.) sau de preparat ce conține una sau mai multe substanțe active.

Mortalitatea: un animal se înregistrează ca mort atunci când este complet imobil.

1.3. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se procedează la expunerea albinelor lucrătoare adulte (*Apis mellifera*) la o serie de doze de substanță testată dizolvată într-un purtător corespunzător, prin aplicare directă pe torace (picături). Durata testului este de 48 h. Dacă rata mortalității crește în intervalul dintre 24 ore și 48 ore în timp ce mortalitatea martorului rămâne la un nivel acceptabil, adică ≤ 10 %, este potrivit să se prelungească durata testului până la maximum 96 h. Mortalitatea se înregistrează zilnic și se compară cu valorile martorului. Se analizează rezultatele pentru a calcula valoarea DL_{50} la 24 h și 48 h și, dacă studiul se prelungește, la 72 h și 96 h.

▼B

1.4. VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valabil, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— media mortalității pentru numărul total de martori trebuie să fie mai mică sau egală cu 10 % la sfârșitul testului;

— DL_{50} a etalonului de toxicitate să se încadreze în intervalul specificat.

1.5. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.5.1. **Colectarea albinelor**

Este necesar să se utilizeze albinele lucrătoare adulte tinere, adică albinele de aceeași vârstă, modalitate de hrană, din același roi etc. Albinele se obțin din colonii hrănite în mod corespunzător, sănătoase, pe cât posibil fără boli și care provin din aceeași regină, cu antecedente și stare fiziologică cunoscute. Acestea se pot colecta în dimineața în care se utilizează sau în seara de dinaintea testului și ținute în condițiile de testare până în ziua următoare. Sunt potrivite albinele colectate din rame fără progenituri. Se evită colectarea primăvara devreme sau toamna târziu, deoarece albinele au o fiziologie modificată în perioadele menționate. Dacă este necesară efectuarea testelor la începutul primăverii sau sfârșitul toamnei, albinele se pot introduce într-un incubator și se hrănesc timp de o săptămână cu „pâinea albinelor” (polen recoltat din fagure) și soluție de zaharoză. Albinele tratate cu substanțe chimice, ca antibiotice, produse antivirale etc. nu se utilizează în testele de toxicitate timp de patru săptămâni din momentul terminării ultimului tratament.

1.5.2. **Condiții de adăpost și hrană**

Se utilizează cuști ușor de curățat și cu ventilație bună. Se poate utiliza un material corespunzător, de exemplu oțel inoxidabil, plasă de sârmă, cuști din material plastic sau din lemn disponibile etc. Dimensiunile cuștilor experimentale trebuie să corespundă numărului de albine, adică să asigure spațiul corespunzător. Se preferă grupuri de 10 albine în fiecare cușcă.

Albinele se țin la întuneric într-o cameră experimentală la o temperatură de 25 ± 2 °C. Pe toată durata testului, se înregistrează umiditatea relativă, care este în mod normal de aproximativ 50-70 %. Manipularea, care include tratamentul și observațiile, se efectuează la lumină (lumina zilei). Ca hrană se utilizează soluție apoasă de zaharoză cu o concentrație finală de 500 g/l (50 % g/v) și se furnizează *ad libitum* pe durata testului, într-un vas de alimentare. Acesta poate să fie o eprubetă (cu lungimea de aproximativ 50 mm și diametrul de aproximativ 10 mm cu capătul deschis îngustat până la un diametru de aproximativ 2 mm).

1.5.3. **Pregătirea albinelor**

Albinele colectate se anesteziază cu bioxid de carbon sau azot pentru aplicarea substanței testate. Cantitatea de anestezic utilizat și durata expunerii trebuie să fie minime. Albinele muribunde se resping și se înlocuiesc cu albine sănătoase înaintea începerii testului.

1.5.4. **Pregătirea dozelor**

Substanța testată urmează să se aplice sub formă de soluție într-un purtător, adică un solvent organic sau o soluție apoasă cu un agent de umectare. Ca solvent organic, se preferă acetona, dar se pot utiliza și alți solvenți organici cu toxicitate mică pentru albine (de exemplu dimetilformamidă, dimetilsulfoxid). Pentru preparatele dispersate în apă și substanțele organice cu polaritate mare, care nu sunt solubile în solvenții organici purtători, soluțiile se pot aplica mai ușor, dacă se prepară într-o soluție slabă de agent de umectare comercializat (de exemplu Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Se prepară soluțiile etalon corespunzătoare, adică, dacă se utilizează un solvent sau un agent de dispersie pentru solubilizarea substanței testate, trebuie să se utilizeze două grupe etalon separate: una tratată cu apă și una tratată cu solvent/agent de dispersie.

1.6. PROCEDURĂ

1.6.1. **Grupele experimentale și cele martor**

Numărul de doze și probe identice experimentate trebuie să satisfacă condițiile statistice pentru determinarea DL_{50} cu limite de încredere de 95 %. În mod normal, sunt necesare pentru test cinci doze în serie geometrică, cu un factor mai mic sau egal cu 2,2 și care să cuprindă valorile pentru DL_{50}. Cu toate acestea, factorul de diluție și numărul de concentrații pentru dozare trebuie să se determine în funcție de panta curbei de toxicitate (doza în funcție de mortalitate) și ținând cont de metoda statistică aleasă pentru analiza rezultatelor. O probă pentru determinarea domeniului permite alegerea concentrațiilor potrivite pentru dozare.

La minimum trei grupe experimentale identice, fiecare de 10 albine, se administrează doze cu fiecare concentrație experimentată.

În afară de seriile tratate cu concentrațiile experimentate, se urmăresc minimum trei serii martor, fiecare de 10 albine. Dacă se utilizează un solvent organic sau un agent de umectare, trebuie să se includă trei serii martor suplimentare, de câte 10 albine fiecare.

1.6.2. **Etalonul de toxicitate**

În seria de teste se include un etalon de toxicitate. Se selectează cel puțin trei doze pentru a cuprinde valorile preconizate ale DL_{50}. Pentru fiecare doză experimentată se utilizează minimum trei cuști identice, fiecare conținând 10 albine. Etalonul de toxicitate preferat este dimetoatul, pentru care DL_{50} – 24 h prin contact semnalată se situează între valorile 0,10-0,35 µg s.a./albină (2). Cu toate acestea, dacă se pot furniza suficiente date pentru verificarea răspunsului preconizat la doză, se pot accepta alte etaloane de toxicitate (de exemplu parationul).

1.6.3. **Expunerea**

1.6.3.1. *Administrarea dozelor*

Albinele anesteziate se tratează individual prin aplicare locală. Albinele se distribuie în mod aleatoriu pentru diferite doze experimentate și diferiți martori. Se aplică un volum de 1 µl soluție de substanță testată în concentrații potrivite cu o micropipetă pe partea dorsală a toracelui fiecărei albine. Dacă este necesar, se pot utiliza alte volume. După aplicare, albinele sunt repartizate în cuști și li se administrează soluții de zaharoză.

1.6.3.2. *Durata*

Durata testului este de preferință de 48 ore. Dacă mortalitatea crește cu mai mult de 10 % între 24 h și 48 h, durata testului se prelungește la maximum 96 ore, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

▼B

1.6.4. **Observațiile**

Mortalitatea se înregistrează la 4 h după administrarea dozelor și apoi la 24 h și 48 h. Dacă este necesară o perioadă prelungită de observare, se fac alte evaluări la intervale de 24 h, până la maximum 96 h, cu condiția ca mortalitatea martorului să fie mai mică sau egală cu 10 %.

Se consemnează toate manifestările anormale observate în timpul desfășurării testului.

1.6.5. **Testul la valori-limită**

În unele cazuri (de exemplu când se preconizează că o substanță testată are o toxicitate mică) se poate efectua un test la valori-limită, utilizând 100 µg s.a./albină pentru a demonstra că DL_{50} este mai mare decât valoarea respectivă. Se utilizează același mod de lucru, care include trei grupe experimentale identice pentru dozele experimentate, martorii relevanți și utilizarea etalonului de toxicitate. Dacă se observă efecte subletale (a se vedea 1.6.4), se consemnează.

2. **DATE ȘI RAPORT**

2.1. DATE

Rezultatele se sistematizează în tabele, care prezintă pentru fiecare grupă supusă tratamentului, precum și pentru grupele martor și cele tratate cu etalon de toxicitate, numărul de albine utilizate, mortalitatea în fiecare moment de observare și numărul de albine cu un comportament negativ. Datele privind mortalitatea se analizează prin metode statistice corespunzătoare (de exemplu analiza probit, media mobilă, probabilitatea binominală) (3) (4). Se trasează curbele doză-răspuns pentru fiecare observare recomandată (adică la 24 h, 48 h și, dacă este relevant, 72 h, 96 h) și se calculează pantele curbelor și dozele letale medii (DL_{50}) cu limite de încredere de 95 %. Sunt posibile corecții pentru mortalitatea martorului cu ajutorul corecției lui Abbott (4) (5). DL_{50} se exprimă în µg de substanță testată per albină.

2.2. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

2.2.1. **Substanța testată:**

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante (de exemplu stabilitatea în apă, presiunea de vapori);

— datele de identificare chimică, care includ formula structurală, puritatea [adică pentru pesticide, identitatea și concentrația substanței (substanțelor) active].

2.2.2. **Speciile experimentale:**

— denumirea științifică, roiul, vârsta aproximativă (în săptămâni), metoda de colectare, data colectării;

— datele privind coloniile din care s-au colectat albinele experimentale, care includ starea de sănătate, eventuale boli ale adulților, tratamente prealabile etc.

▼B

2.2.3. **Condiții de testare:**

— temperatura și umiditatea relativă în camera experimentală;

— condițiile de adăpost care includ tipul, dimensiunea și materialul cuștilor;

— metodele de administrare a substanței testate, de exemplu solventul purtător utilizat, volumul soluției de substanță testată aplicat, anestezicele utilizate;

— protocolul testului, de exemplu numărul de încercări și concentrațiile testate, numărul de martori; pentru fiecare concentrație experimentată și martor, numărul de cuști identice, și numărul de albine per cușcă;

— data efectuării testului.

2.2.4. **Rezultatele:**

— rezultatele studiului preliminar de determinare a domeniului, dacă s-a efectuat;

— datele brute: mortalitatea la fiecare concentrație experimentată și fiecare moment de observare;

— trasarea curbelor doză-răspuns la sfârșitul testului;

— valorile DL_{50} cu limite de încredere de 95 %, la fiecare din momentele de observare recomandate, pentru substanța testată și etalonul de toxicitate;

— metodele statistice utilizate pentru determinarea DL_{50};

— mortalitatea la martori;

— alte efecte biologice observate sau măsurate și orice răspunsuri anormale ale albinelor;

— orice abatere de la modul de lucru descris și orice alte date relevante.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, p. 151-165. March, 1993.

2. Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, p. 119-125.

3. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

4. Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5. Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, p. 265-267.

▼B

C.18. ADSORBȚIA/DESORBȚIA PRINTR-O METODĂ DE STABILIRE A ECHILIBRULUI PROBELOR

1. METODĂ

Prezenta metodă reproduce Orientarea 106 a OCDE pentru determinarea adsorbției/desorbției printr-o metodă de stabilire a echilibrului probelor (2000).

1.1. INTRODUCERE

Metoda ia în considerare un test de intercalibrare și un schimb de experiență în vederea selecției solului pentru realizarea unei încercări de adsorbție (1) (2) (3) (4) și, de asemenea, liniile directoare existente la nivel național (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Studiile de adsorbție/desorbție sunt utile pentru obținerea de date esențiale privind mobilitatea substanțelor chimice și distribuția acestora în compartimentele solului, apei și aerului din biosferă (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Datele se pot utiliza pentru a prognoza sau estima, de exemplu, predispoziția unei substanțe chimice pentru degradare (22) (23), transformare sau asimilare de organisme (24); extracție prin spălare în profilul solului (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilitate din sol (21) (29) (30); scurgere de pe suprafața terenurilor în apele naturale (18) (31) (32). Rezultatele adsorbției se pot utiliza pentru comparare și modelare (19) (33) (34) (35).

Distribuția unei substanțe chimice între fazele solului și cea apoasă este un proces complex care depinde de o serie de factori diferiți: natura chimică a substanței (12) (36) (37) (38) (39) (40), caracteristicile solului (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), factorii climatici cum sunt precipitațiile atmosferice, temperatura, lumina soarelui și vântul. Astfel, numeroasele fenomene și mecanisme implicate în procesul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol nu se pot explica în întregime printr-un model simplificat de laborator, cum este prezenta metodă. Cu toate acestea, chiar dacă o experiență de acest fel nu poate să cuprindă toate cazurile posibile din mediu, poate furniza date valoroase privind relația dintre mediul înconjurător și adsorbția unei substanțe chimice.

A se vedea și introducerea generală.

1.2. DOMENIUL DE APLICARE

Metoda are ca obiect determinarea comportamentului de adsorbție/desorbție al unei substanțe pe diferite soluri. Scopul este obținerea unei valori a sorbției care să se poată utiliza la prognoza repartiției în condiții de mediu diferite; în acest scop, se determină coeficienții de adsorbție la echilibru pentru o substanță chimică pe diferite soluri în funcție de caracteristicile solului (de exemplu, conținutul de carbon organic, conținutul de argilă și structura și pH-ul solului). Trebuie să se utilizeze tipuri diferite de soluri pentru a cuprinde cât mai multe interacțiuni posibile ale unei anumite substanțe cu solurile existente în natură.

În prezenta metodă, adsorbția reprezintă procesul de legare a unei substanțe chimice la suprafețele solurilor; nu se poate face deosebire între diferitele procese de adsorbție (adsorbția fizică și chimică) și procese ca degradarea catalizată a suprafeței, adsorbția în grosime sau reacția chimică. Adsorbția care apare pe particulele coloidale (diametrul < 0,2 μm) generate de soluri nu se ia în considerare.

▼B

Parametrii solurilor considerați cei mai importanți pentru adsorbție sunt: conținutul de carbon organic (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); conținutul de argilă și structura solului (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) și valoarea pH-ului pentru compușii ionizabili (3) (4) (42). Alți parametri ai solurilor care pot să aibă un impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe sunt: capacitatea efectivă de schimb de cationi (CESC), conținutul de oxizi de fier și aluminiu amorfi, în special pentru solurile vulcanice și tropicale (4), precum și suprafața specifică (49).

Testarea este destinată evaluării adsorbției unei substanțe chimice pe diferite tipuri de soluri cu valori diferite ale conținutului de carbon organic, ale conținutului de argilă și ale structurii solului și ale pH-ului. Aceasta conține trei etape:

Etapa 1: Studiu preliminar pentru determinarea:

— raportului sol/soluție;

— timpului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru;

— adsorbției substanței testate pe suprafața vaselor experimentale și stabilității substanței testate în timpul încercării.

Etapa 2: Proba de identificare: se studiază adsorbția pe cinci tipuri diferite de soluri cu ajutorul cineticii adsorbției la o singură concentrație și se determină coeficienții de distribuție K_d și K_{co}.

Etapa 3: Determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru stabilirea influenței concentrației asupra gradului de adsorbție pe soluri.

Studiul desorbției cu ajutorul cineticii de desorbție/izotermele de desorbție Freundlich (apendicele 1).

1.3. DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

Simbol	Definiție	Unități
A_{t_i}	adsorbția la momentul t_i	%
A_{ec}	adsorbția la stabilirea echilibrului de adsorbție	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa substanței testate adsorbite pe sol la momentul t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa substanței testate adsorbite pe sol în intervalul de timp Δt_i	µg
$m_s^{ads}(ec)$	masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție	µg
m_0	masa substanței testate din eprubetă, la începutul analizei de adsorbție	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masa substanței testate măsurate într-un alicot (v_a^A) la momentul t_i	µg
$m_{ap}^{ads}(ec)$	masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție	µg
m_{sol}	cantitatea fazei de sol, exprimată în substanță uscată a solului	g

▼B

Simbol	Definiție	Unități
C_{sm}	concentrația masică a soluției mamă de substanță	μg cm^{-3}
C_0	concentrația masică inițială a soluției testate în contact cu solul	μg cm^{-3}
$C_{ap}^{ads}(t_i)$	concentrația masică a substanței în fază apoasă la momentul t_i de efectuare a încercării	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(ec)$	conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție	μg g^{-1}
$C_{ap}^{ads}(ec)$	concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție	μg cm^{-3}
V_0	volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul în timpul încercării de adsorbție	cm^3
v_a^A	volumul alicotului în care se măsoară substanța testată	cm^3
K_d	coeficientul de distribuție pentru adsorbție	cm^3 g^{-1}
K_{co}	coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic	cm^3 g^{-1}
K_{so}	coeficientul de distribuție normalizată a substanței organice	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coeficientul de adsorbție Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	exponentul Freundlich	
D_{t_i}	desorbția la momentul t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorbția corespunzătoare unui interval de timp Δt_i	%
K_{des}	coeficientul de desorbție aparentă	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coeficientul de desorbție Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{ap}^{des}(t_i)$	masa substanței testate desorbite din sol la momentul t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	masa substanței testate desorbite din sol în intervalul de timp Δt_i	μg
$m_m^{des}(ec)$	masa substanței, determinată analitic în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție	μg
$m_{ap}^{des}(ec)$	masa totală a substanței testate desorbite la stabilirea echilibrului de desorbție	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masa substanței adsorbită în continuare pe sol după intervalul de timp Δt_i	μg
m_{ap}^A	masa substanței rămase de la stabilirea echilibrului de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului	μg
$C_s^{des}(ec)$	conținutul de substanță testată adsorbită în continuare pe sol la stabilirea echilibrului de desorbție	μg g^{-1}

▼B

Simbol	Definiție	Unități
$C_{ap}^{des}(ec)$	concentrația masică a substanței testate în fază apoasă la stabilirea echilibrului de desorbție	μg cm^{-3}
V_T	volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie	cm^3
V_R	volumul supernatantului scos din eprubetă după stabilirea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum dintr-o soluție 0,01 M de $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volumul unui alicot din care s-au luat probe pentru analiză la momentul (i), în timpul experimentării cineticii de desorbție prin metoda în serie	cm^3
$V_{ra}i^D$	volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru determinarea substanței testate, în experimentarea cineticii de desorbție prin metoda paralelă	cm^3
V_r^F	volumul soluției luate din eprubetă pentru determinarea substanței testate, la stabilirea echilibrului de desorbție	cm^3
BM	bilanțul masic	%
m_E	masa totală a substanței testate extrase din sol și pereții vasului experimental în două etape	μg
V_{rec}	volumul supernatantului recuperat după stabilirea echilibrului de adsorpție	cm^3
P_{ow}	coeficientul de partiție octanol/apă	
pKa	constanta de disociere	
S_a	solubilitatea apei	g l^{-1}

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se adaugă volume cunoscute de soluții ale substanței testate, nemarcate sau marcate radioactiv, în concentrații cunoscute în $CaCl_2$ 0,01 M, la probele de sol cu un conținut de substanță uscată cunoscut, care au fost aduse în prealabil la echilibru în $CaCl_2$ 0,01 M. Se agită amestecul un timp corespunzător. Suspensiile de sol se separă apoi prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare și se analizează faza apoasă. Se calculează cantitatea de substanță testată adsorbită pe proba de sol prin diferența dintre cantitatea de substanță testată prezentă inițial în soluție și cantitatea rămasă la sfârșitul experimentării (metoda indirectă).

Ca alternativă, cantitatea de substanță testată adsorbită se mai poate determina direct prin analiza solului (metoda directă). Această metodă, care include extracția treptată a solului cu un solvent potrivit, se recomandă în cazurile în care concentrația diferită în soluție a substanței nu se poate determina cu precizie. Exemple de asemenea cazuri sunt: adsorbția substanței testate pe suprafața vaselor experimentale, instabilitatea substanței testate pe durata experimentării, adsorbția slabă care generează doar modificări mici ale concentrației în soluție și adsorbția puternică care generează concentrații mici care nu se pot determina cu precizie. Dacă se utilizează o substanță marcată radioactiv, se poate evita extracția solului prin analiza fazei de sol prin calcinare și numărătoarea în scintilație lichidă. Cu toate acestea, numărătoarea în scintilație lichidă este un procedeu nespecific care nu poate să facă diferența dintre produsele de bază și cele de transformare; prin urmare, se utilizează numai în situația în care substanța chimică testată este stabilă pe durata studiului.

▼B

1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA TESTATĂ

Reactivii chimici trebuie să fie de tip analitic. Se recomandă utilizarea substanțelor de testare nemarcate cu o compoziție cunoscută și, de preferat, cu o puritate de minimum 95 % sau a substanțelor de testare marcate radioactiv cu o compoziție și puritate cunoscute. La indicatorii cu perioada de înjumătățire scurtă se aplică corecții de dezintegrare.

Înaintea realizării unei încercări de adsorbție/desorbție, trebuie să fie cunoscute datele referitoare de substanța testată, prezentate în continuare:

(a) solubilitatea în apă (A.6);

(b) presiunea de vapori (A.4) și constanta legii lui Henry;

(c) degradarea abiotică: hidroliza în funcție de pH (C.7);

(d) coeficientul de partiție (A.8);

(e) biodegradabilitatea imediată (C.4) sau transformarea aerobică și anaerobică în sol;

(f) pKa pentru substanțele ionizabile;

(g) fotoliza directă în apă (adică spectrul de absorbție UV-vizibil în apă, randamentul cuantic) și fotodegradarea pe sol.

1.6. APLICABILITATEA TESTULUI

Testarea se poate aplica substanțelor chimice pentru care este disponibilă o metodă analitică suficient de precisă. Un parametru important care influențează credibilitatea rezultatelor, în special atunci când se utilizează metoda indirectă, este stabilitatea substanței testate în scara de timp a probei. Prin urmare, este necesară verificarea stabilității într-un studiu preliminar; dacă, în scara de timp a încercării, se observă o modificare, se recomandă ca studiul principal să se realizeze prin analizarea atât a solului, cât și a fazelor apoase.

În realizarea prezentei încercări, pot să apară dificultăți pentru substanțele cu solubilitate mică în apă ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), precum și pentru substanțele cu sarcini mari, deoarece concentrația în faza apoasă nu se poate măsura analitic cu suficientă precizie. În situațiile de acest fel, trebuie să se ia măsuri suplimentare. Modalitatea de rezolvare a acestor probleme se indică, orientativ, la punctele respective ale prezentei metode.

La testarea substanțelor volatile, trebuie să se aibă grijă să se evite pierderile în timpul studiului.

1.7. DESCRIEREA METODEI

1.7.1. **Aparatura și reactivii chimici**

Aparatură standard de laborator, în special cea prezentată în continuare:

(a) Eprubete sau vase pentru realizarea experimentelor. Este important ca eprubetele și vasele respective:

— să fie instalate direct în centrifugă pentru a minimiza erorile de manipulare și transfer;

— să fie obținute dintr-un material inert, care minimizează adsorbția substanței testate pe suprafața acestora.

▼B

(b) Agitator: agitator acționat de sus sau un dispozitiv echivalent; agitatorul menține solul în suspensie în timpul agitării.

(c) Centrifugă: de preferință una de viteză mare, de exemplu forțele de centrifugare > 3 000 g, termoreglabilă, care să poată să separe particulele cu diametrul mai mare de 0,2 μm din soluția apoasă. Recipientele trebuie să fie închise în timpul agitării și centrifugării pentru a evita volatilizarea și pierderile de apă; pentru a minimiza adsorbția pe acestea, se recomandă utilizarea capacelor dezactivate, cum ar fi capacele cu filet căptușite cu teflon.

(d) Opțional: dispozitiv de filtrare; filtre cu o porozitate de 0,2 μm, sterile, de unică folosință. Trebuie să se acorde o atenție deosebită la alegerea materialului pentru filtru, pentru a evita pierderile de substanță testată pe acesta; pentru substanțele testate cu solubilitate mică, nu se recomandă un material de filtrare organic.

(e) Instrumente analitice, potrivite pentru măsurarea concentrației substanței testate.

(f) Etuvă de laborator care permite menținerea unei temperaturi de 103-110 ^{o}C.

1.7.2. **Caracterizarea și selectarea solurilor**

Solurile se caracterizează prin trei parametri de care se consideră că depinde în mare măsură capacitatea adsorbantă: carbonul organic, conținutul de argilă și structura solului și pH-ul. După cum s-a menționat deja (a se vedea Domeniul de aplicare), și alte proprietăți fizico-chimice ale solului pot să aibă impact asupra adsorbției/desorbției unei anumite substanțe și aceste cazuri trebuie avute în vedere.

Metodele utilizate pentru caracterizarea solului sunt foarte importante și pot avea o influență semnificativă asupra rezultatelor. Prin urmare, se recomandă ca pH-ul solului să se măsoare într-o soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (adică soluția utilizată în testarea de adsorbție/desorbție) conform metodei ISO corespunzătoare (ISO-10390-1). Se mai recomandă determinarea altor proprietăți relevante ale solului conform metodelor standard (de exemplu „Îndreptarul pentru analiza solului” ISO); acest lucru permite ca analiza datelor privind sorbția să se facă pe baza parametrilor solului standardizați la nivel mondial. O orientare pentru metodele standard existente pentru analiza și caracterizarea solului este oferită în bibliografie (50-52). Pentru etalonarea metodelor de analiză a solului, se recomandă utilizarea solurilor de referință.

O orientare privind selecția solurilor pentru încercările de adsorbție/desorbție se prezintă în tabelul 1. Cele șapte soluri selectate cuprind tipurile de soluri întâlnite în zonele geografice temperate. Pentru substanțele testate ionizabile, solurile selectate trebuie să cuprindă un domeniu larg de pH, pentru a fi posibilă evaluarea adsorbției substanței în formele ionizată și neionizată ale acesteia. O orientare privind modul de utilizare a mai multor soluri diferite în diferite etape ale încercării se prezintă la punctul 1.9 Realizarea încercării.

Dacă se preferă alte tipuri de soluri, este necesar ca parametrii și variația proprietăților acestora să fie similare cu cele descrise în tabelul 1, chiar dacă nu satisfac criteriile cu exactitate.

▼B

Tabelul 1

Orientare pentru selectarea probelor de soluri pentru adsorbție-desorbție

Tipul solului	Valorile pH-ului (în $CaCl_2$ 0,01 M)	Conținutul de carbon organic (%)	Conținutul de argilă (%)	Structura solului [1]
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	argilă
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	pământ argilos-nisipos
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	argilă nisipoasă din aluviuni
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	argilă nisipoasă
5	< 4,0 - 6,0 [2]	< 0,5 - 1,5 [2] [3]	< 10-15 [2]	nisip argilos
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 [2] [3]	40-65	pământ argilos-nisipos/ argilă
7	< 4,5	> 10	< 10	nisip/nisip argilos

[1] Conform FAO și sistemului SUA (85).
[2] Este de preferat ca parametrii respectivi să prezinte valori în domeniul dat. Dacă, totuși, apar dificultăți în găsirea unui sol corespunzător, se acceptă valorile mai mici decât minimum indicat.
[3] Solurile cu un conținut de carbon organic mai mic de 3 % pot schimba corelația dintre conținutul de substanțe organice și adsorbție. Astfel, se recomandă utilizarea solurilor cu un conținut minimum de carbon organic de 0,3 %.

1.7.3. **Colectarea și depozitarea probelor de sol**

1.7.3.1. *Colectarea*

Nu se recomandă tehnici de prelevare a probelor sau instrumente specifice; tehnica de prelevare a probelor depinde de scopul studiului (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Se au în vedere cele menționate în continuare:

(a) este necesară o descriere detaliată a situației terenului; aceasta include poziția, acoperirea cu vegetație, tratamentul cu pesticide și îngrășăminte, adaosuri biologice sau contaminarea accidentală. Este necesar să se respecte recomandările standardelor ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la descrierea locului de prelevare a probelor;

(b) locul de prelevare a probelor trebuie să fie stabilit cu ajutorul UTM (proiecția Mercator transversală universală/cota convențională europeană) sau a coordonatelor geografice; astfel ar fi posibilă repetarea colectării unui anumit sol în viitor sau ar ajuta la încadrarea solului în diferite sisteme de clasificare utilizate în diferite țări. De asemenea, se recomandă să se colecteze sol numai din planul de referință A de până la 20 cm adâncime. În special pentru tipul de sol nr. 7, dacă există un plan de referință O_h ca parte a solului, acesta se include în prelevarea probelor.

Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură care să garanteze păstrarea proprietăților inițiale ale solului, nealterate în mare parte.

▼B

1.7.3.2. *Depozitarea*

Se preferă utilizarea solurilor proaspăt colectate de pe teren. Numai dacă acest lucru nu este posibil, solul se poate păstra la temperatura ambiantă și în aer uscat. Nu se recomandă termene-limită, dar solurile depozitate mai mult de trei ani se analizează din nou înaintea utilizării pentru determinarea conținutului de carbon organic, pH-ului și CSC (capacitatea de schimb de cationi).

1.7.3.3. *Manipularea și pregătirea probelor de sol pentru testare*

Solurile se usucă în aer la temperatura ambiantă (de preferință la 20-25 ^{o}C). Dezagregarea se realizează cu o forță minimă, astfel încât structura originală a solului să se modifice cât se poate de puțin. Solurile se cern până la dimensiuni ale particulelor $\leq$ 2 mm; se respectă recomandările standardului ISO privind prelevarea probelor de sol (ISO 10381-6), referitoare la cernere. Se recomandă omogenizarea atentă, deoarece aceasta crește reproductibilitatea rezultatelor. Conținutul de umiditate din fiecare sol se determină pe trei alicoți și încălzire la 105 ^{o}C până la greutate constantă (aproximativ 12 ore). În toate calculele, pentru masa de sol se consideră masa uscată în etuvă, adică greutatea solului la care se aplică corecția pentru conținutul de umiditate.

1.7.4. **Pregătirea substanței testate pentru aplicarea pe sol**

Substanța testată se dizolvă într-o soluție de $CaCl_2$ 0,01 M în apă distilată sau apă deionizată; soluția de $CaCl_2$ se utilizează sub formă de fază apoasă de solvent pentru îmbunătățirea centrifugării și minimizarea schimbului de cationi. Concentrația soluției mamă este, de preferință, mai mare cu trei ordine de mărime decât limita de detecție a metodei analitice utilizate. Pragul menționat asigură măsurători precise pentru metodologia urmată în prezenta metodă; în afară de aceasta, concentrația soluției mamă trebuie să fie mai mică decât solubilitatea în apă a substanței testate.

Este de preferat ca soluția mamă să se prepare chiar înaintea aplicării pe probele de sol și să se păstreze închisă, la întuneric, la 4 ^{o}C. Durata depozitării depinde de stabilitatea substanței testate și de concentrația acesteia în soluție.

Numai pentru substanțele cu solubilitate mică ($S_a < 10^{-4}$ g l^{-1}), ar putea să fie necesar un agent de solubilizare corespunzător, dacă dizolvarea substanței testate este dificilă. Agentul de solubilizare respectiv: (a) trebuie să fie miscibil cu apa, de exemplu metanol sau acetonitril; (b) concentrația acestuia nu trebuie să fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției mamă și să reprezinte mai puțin decât cea din soluția substanței testate care va veni în contact cu solul (de preferință mai mică de 0,1 %); și (c) nu trebuie să fie un agent tensioactiv sau să intre în reacții solvolitice cu substanța chimică testată. Utilizarea unui agent de solubilizare se stipulează și se justifică în raportarea rezultatelor.

O altă posibilitate pentru substanțele cu solubilitate mică constă în adăugarea substanței testate în sistemul experimental prin îmbogățire: substanța de testat se dizolvă într-un solvent organic, din care se ia un alicot care se adaugă în sistemul format din sol și soluție de $CaCl_2$ 0,01 M în apă distilată sau deionizată. Conținutul de solvent organic în faza apoasă se menține cât se poate de mic, de obicei mai mic sau egal cu 0,1 %. Se poate ca îmbogățirea dintr-o soluție organică să nu fie reproductibilă din punct de vedere al volumului. Astfel, se poate introduce încă o eroare, deoarece concentrația substanței testate și a cosolventului s-ar putea să nu fie aceleași în toate încercările.

▼B

1.8. CONDIȚII NECESARE PENTRU REALIZAREA TESTULUI DE ADSORBȚIE/DESORBȚIE

1.8.1. **Metoda analitică**

Parametrii importanți care pot să influențeze precizia măsurătorilor de sorbție includ acuratețea metodei analitice pentru analiza atât a fazei soluției, cât și a celei adsorbite, stabilitatea și puritatea substanței testate, realizarea echilibrului de sorpție, amploarea variației concentrației soluției, raportul sol/soluție și modificările din structura solului în timpul procesului de stabilire a echilibrului (35) (59)-(62). Câteva exemple privind problemele de acuratețe sunt prezentate în apendicele 2.

Trebuie să se verifice fiabilitatea metodei analitice pentru un domeniu de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Cercetătorul trebuie să aibă libertatea de a elabora o metodă potrivită care să prezinte acuratețe, precizie, reproductibilitate, limite de detecție și recuperare optime. În continuare, se oferă o orientare privind modul de efectuare a acestei încercări.

Un volum potrivit de $CaCl_2$ 0,01 M, de exemplu 100 cm^3, se supune agitării timp de 4 ore împreună cu o cantitate de sol, de exemplu 20 g, cu o capacitate mare de adsorbție, adică cu un conținut mare de carbon organic și argilă; greutățile și volumele menționate pot să varieze în funcție de necesitățile analitice, dar ca punct de plecare se preferă un raport sol/soluție de 1:5. Amestecul se supune centrifugării și faza apoasă se poate filtra. Se adaugă un volum determinat de soluție mamă a substanței testate la aceasta din urmă pentru a obține o concentrație nominală care să se încadreze în domeniul de concentrații care se pot întâlni în timpul încercării. Volumul respectiv trebuie să fie mai mic sau egal cu 10 % din volumul final al fazei apoase, pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției la preechilibru. Se analizează soluția.

Pentru verificarea artefactelor din metoda analitică și a efectelor de matrice provocate de sol, trebuie să se includă o probă oarbă care să conțină sistemul sol + soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără substanța testată).

Metodele analitice care se pot utiliza pentru măsurători de sorbție includ cromatografia gaz-lichid (CGL), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), spectrometria (de exemplu GC/spectrometrie de masă, HPLC/spectrometrie de masă) și numărătoare în scintilație lichidă (pentru substanțele marcate radioactiv). Indiferent de metoda analitică utilizată, se consideră că este bine, dacă recuperările se situează între 90 % și 110 % din valoarea nominală. Pentru a permite detectarea și evaluarea după ce a avut loc partiția, este necesar ca limitele de detecție ale metodei analitice să fie cu cel puțin două ordine de mărime mai mici decât concentrația nominală.

Caracteristicile și limitele de detecție ale metodei analitice disponibile pentru efectuarea studiilor de adsorbție joacă un rol important în stabilirea condițiilor de testare și în întreaga desfășurare a încercării. Metoda urmează o cale experimentală generală și oferă recomandări și orientare pentru alte soluții, dacă există posibilitatea impunerii unor restricții datorită metodei analitice și dotării laboratorului.

▼B

1.8.2. **Selectarea raporturilor optime sol/soluție**

Selectarea raporturilor optime sol/soluție pentru studiile se sorbție depinde de coeficientul de distribuție K_d și de gradul relativ al adsorbției dorite. Modificarea concentrației substanței în soluție determină acuratețea statistică a măsurătorii, datorită formei ecuației pentru adsorbție și limitei de detecție a metodologiei analitice, în determinarea concentrației substanței chimice în soluție. Prin urmare, în practica generală, este util să se stabilească câteva raporturi fixe, pentru care procentul adsorbit să fie mai mare de 20 % și de preferință > 50 % (62), având grijă în același timp să se mențină o concentrație suficient de mare a substanței testate în fază apoasă, pentru a fi măsurată cu acuratețe. Acest lucru este deosebit de important pentru cantitățile mari, în procente, adsorbite.

Un procedeu comod de selectare a raporturilor optime sol/apă constă în estimarea valorii K_d fie prin studii preliminare, fie prin tehnici de estimare stabilite (apendicele 3). Apoi, selectarea unui raport optim se poate realiza cu ajutorul reprezentării grafice a raportului sol/soluție în funcție de K_d pentru procente stabilite ale adsorbției (figura 1). În reprezentarea grafică menționată, se consideră că ecuația de adsorbție este liniară ([1]). Relația aplicabilă se obține printr-o ecuație de rearanjare (4) a K_d sub forma ecuației (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(ec)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

sau sub forma sa logaritmică, considerând că $R = m_{sol}/V_0$ și $\frac{A_{ec}\%}{100} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{ec}\%/100}{1 - A_{ec}\%/100}\right] \qquad (2)$$

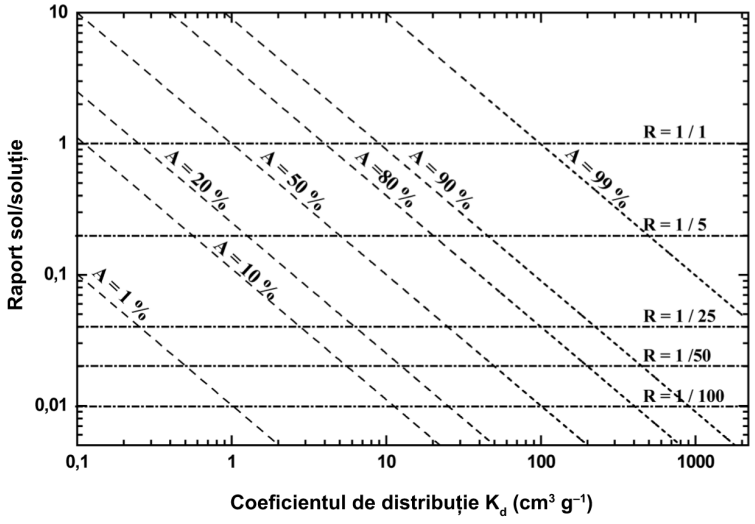


Figura 1 Relația dintre raporturile sol/soluție și K_d la diferite procente de substanță testată adsorbită

([1]) $C_s^{ads}(ec) = K_d \cdot C_{ap}^{ads}(ec)$.

▼B

Figura 1 prezintă raporturile sol/soluție în funcție de K_d pentru diferite valori ale adsorbției. De exemplu, pentru un raport sol/soluție de 1:5 și o valoare a K_d de 20, ar avea loc o adsorbție de 80 %. Pentru a obține o adsorbție de 50 % pentru aceeași valoare a K_d, trebuie să se utilizeze un raport de 1:25. Acest procedeu pentru selectarea raporturilor optime sol/soluție oferă persoanei care efectuează studiul flexibilitatea de a satisface necesitățile experimentale.

Zonele care sunt mai greu de rezolvat sunt cele în care substanța chimică este puternic sau foarte puțin adsorbită. Dacă se produce o adsorbție slabă, se recomandă un raport sol/soluție de 1:1, deși s-ar putea ca pentru unele tipuri de soluri foarte organice să fie necesare raporturi mai mici pentru a obține un mâl. La metodologia analitică, trebuie să se acorde o atenție deosebită la măsurarea modificărilor mici ale concentrației soluției; în caz contrar, măsurarea adsorbției nu va fi exactă. Pe de altă parte, la valori foarte mari ale coeficienților de distribuție K_d, se poate merge până la un raport sol/soluție de 1:100 pentru a lăsa o cantitate importantă de substanță chimică în soluție. Cu toate acestea, trebuie mare grijă pentru asigurarea unei amestecări bune și sistemul trebuie lăsat un timp suficient pentru stabilirea echilibrului. Un alt procedeu utilizat pentru rezolvarea cazurilor extreme de acest tip, atunci când nu există o metodologie analitică specifică, constă în estimarea valorii K_d cu ajutorul unor procedee de estimare, de exemplu, cu ajutorul valorilor P_{ow} (apendicele 3). Acesta ar putea să fie util, în special pentru substanțele chimice puțin adsorbite/polare, cu $P_{ow} < 20$ și pentru substanțele chimice lipofile/care se adsorb puternic, cu $P_{ow} > 10^4$.

1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.9.1. Condiții de testare

Toate testele se realizează la temperatura ambiantă și, dacă este posibil, la o temperatură constantă între 20 °C și 25 °C.

Condițiile de centrifugare trebuie să permită eliminarea particulelor mai mari de 0,2 μm din soluție. Valoarea menționată activează particulele de cele mai mici dimensiuni care sunt considerate particule solide și reprezintă limita dintre particulele solide și coloidale. O orientare asupra modului de determinare a condițiilor de centrifugare se prezintă în apendicele 4.

Dacă dispozitivele de centrifugare nu pot să garanteze eliminarea particulelor mai mari de 0,2 μm, se poate utiliza o combinație de centrifugare cu filtrare, cu filtre de 0,2 μm. Filtrele de acest tip ar trebui realizate dintr-un material inert potrivit pentru a evita pierderile de substanță testată pe acestea. În orice caz, trebuie dovedit că nu se produc pierderi de substanță testată în timpul filtrării.

1.9.2. **Etapa 1 – Studiu preliminar**

Scopul realizării unui studiu preliminar a fost deja prezentat la punctul „Domeniu de aplicare”. O orientare privind inițierea unei încercări de acest tip se prezintă în experimentul propus în continuare.

1.9.2.1. *Selectarea raporturilor optime sol/soluție*

Se utilizează două tipuri de soluri și trei raporturi sol/soluție (șase probe). Un tip de sol are conținut mare de carbon organic și conținut mic de argilă și celălalt are conținut mic de carbon organic și conținut mare de argilă. Se propun următoarele raporturi sol/soluție:

— 50 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/1);

▼B

— 10 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/5);

— 2 g sol și 50 cm^3 soluție apoasă de substanță testată (raport 1/25).

Cantitatea minimă de sol pe care se poate efectua testarea depinde de dotările din laborator și de performanța metodelor analitice utilizate. Cu toate acestea, se recomandă să se utilizeze cel puțin 1 g și, de preferință, 2 g, pentru a obține rezultate credibile în urma încercărilor.

O probă martor care conține numai substanța testată în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune unor etape precis identice cu cele ale sistemelor studiate, pentru a verifica stabilitatea substanței testate în soluție de $CaCl_2$ și posibilitatea adsorbției acesteia pe suprafețele vaselor experimentale.

O probă oarbă pentru fiecare sol, care conține aceeași cantitate de sol și un volum total de 50 cm^3 de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără substanța testată) se supune aceluiași procedeu de testare. Acesta reprezintă principalul control în timpul analizei pentru detectarea substanțelor care interferează sau a solurilor contaminate.

Toate încercările, inclusiv cele cu probă martor și probă oarbă, se realizează cel puțin de două ori. Numărul total de probe care trebuie pregătite pentru studiu se poate calcula ținând seama de metodologia care va fi urmată.

Metodele pentru studiul preliminar și studiul principal sunt, în general, aceleași, excepțiile fiind menționate, dacă este cazul.

Probele de sol uscate în aer se aduc la echilibru prin agitare cu un volum minim de 45 cm^3 de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M peste noapte (12 h) înaintea zilei în care se efectuează testarea. Apoi, se adaugă un volum determinat din soluția mamă a substanței testate pentru a aduce volumul final la 50 cm^3. Volumul respectiv de soluție mamă adăugat: (a) nu trebuie să fie mai mare de 10 % din volumul final de 50 cm^3 de fază apoasă pentru a modifica cât se poate de puțin natura soluției de prestabilire a echilibrului; (b) trebuie să dea, de preferință, o concentrație inițială a substanței testate în contact cu solul (C_0) cu cel puțin două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice; pragul menționat asigură posibilitatea de a efectua măsurători exacte chiar și atunci când se produc adsorbții puternice (> 90 %) și de determinare a izotermelor de adsorbție. Se recomandă, dacă este posibil, ca și concentrația inițială a substanței (C_0) să nu fie mai mare decât jumătate din limita de solubilitate a acesteia.

În continuare se prezintă un exemplu de mod de calcul al concentrației soluției mamă (C_{sm}). Se consideră o limită de detecție de 0,01 $\mu g\ cm^{-3}$ și o adsorbție de 90 %; astfel, concentrația inițială a substanței testate în contact cu solul este, de preferință, de 1 $\mu g\ cm^{-3}$ (cu două ordine de mărime mai mare decât limita de detecție). Considerând că se adaugă volum maxim recomandat de soluție mamă, adică 5-45 cm^3 soluție de echilibrare de $CaCl_2$ 0,01 M (= 10 % din soluția mamă până la 50 cm^3 volumul total al fazei apoase), concentrația soluției mamă este de 10 $\mu g\ cm^{-3}$; aceasta este cu trei ordine de mărime mai mare decât limita de detecție a metodei analitice.

Se măsoară valoarea pH-ului fazei apoase înainte și după contactul cu solul, deoarece joacă un rol important în întregul proces de adsorbție, în special pentru substanțele ionizabile.

▼B

Amestecul se agită până la stabilirea echilibrului de adsorbție. Momentul stabilirii echilibrului în sol variază în mare măsură, în funcție de substanța chimică și de sol; în general, este suficient un timp de 24 h (77). În studiul preliminar, probele se pot colecta la anumite intervale de timp din cele 48 de ore de amestecare (de exemplu la 4, 8, 24, 48 h). Cu toate acestea, momentele în care se fac determinările se stabilesc și în funcție de programul de lucru al laboratorului.

Există două opțiuni pentru analiza substanței testate în soluție apoasă: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Trebuie să se sublinieze că, deși metoda paralelă este mai incomodă din punct de vedere experimental, tratarea matematică a rezultatelor este mai simplă (apendicele 5). Cu toate acestea, alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să ia în considerare dotarea și resursele de care dispune laboratorul.

(a) Metoda paralelă: se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu intervalele de timp la care se dorește să se studieze cinetica adsorbției. După centrifugare și dacă se dorește filtrarea, se recuperează faza apoasă din prima eprubetă cât se poate de complet și se măsoară după, de exemplu, 4 h, cea din a doua eprubetă după 8 h, cea din a treia după 24 h etc.

(b) Metoda în serie: se prepară doar o probă dublă pentru fiecare raport sol/soluție. La intervale determinate de timp, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot din faza apoasă pentru determinarea substanței testate; apoi testarea continuă cu amestecul inițial. Dacă se aplică filtrarea după centrifugare, laboratorul trebuie să dispună de dispozitivele pentru realizarea filtrării unor mici alicoți din soluția apoasă. Se recomandă ca volumul total al alicoților luați să nu fie mai mare de 1 % din volumul total al soluției, pentru nu a modifica semnificativ raportul sol/soluție și pentru a reduce masa substanței dizolvate care poate să fie adsorbită în timpul încercării.

Se calculează adsorbția A_{t_i}, în procente, la fiecare moment (t_i) în funcție de concentrația inițială nominală și concentrația măsurată în momentul prelevării probei (t_i), se corectează cu valoarea probei oarbe. Se reprezintă grafic A_{t_i} în funcție de timp (apendicele 5 figura 1) pentru a estima stabilirea palierului de echilibru ([1]). Se mai calculează valoarea K_d la echilibru. În funcție de această valoare K_d, se selectează raporturile optime sol/soluție din figura 1, astfel încât adsorbția în procente să ajungă la mai mult de 20 % și, de preferință, la > 50 % (61). Toate ecuațiile și principiile aplicabile se prezintă la punctul „Rezultatele și raportarea acestora” și în apendicele 5.

1.9.2.2. *Determinarea momentului de stabilire a echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru*

După cum s-a menționat deja, reprezentările grafice ale A_{t_i} sau C_{aq}^{ads} în funcție de timp permit estimarea stabilirii echilibrului de adsorbție și a cantității de substanță testată adsorbită la echilibru. Figurile 1 și 2 din apendicele 5 prezintă exemple de asemenea reprezentări grafice. Momentul de stabilire a echilibrului reprezintă nevoia sistemului de a ajunge la un palier.

([1]) Reprezentările grafice ale concentrației substanței de testat în fază apoasă (C_{ap}^{ads}) în funcție de timp s-ar mai putea utiliza la estimarea atingerii palierului de echilibru (apendicele 5 figura 2).

▼B

Dacă, pentru un anumit sol, nu se găsește un palier, ci o creștere constantă, acest lucru se poate datora unor factori care complică situația, cum ar fi biodegradarea sau difuzia lentă. Biodegradarea se poate pune în evidență prin repetarea încercării cu o probă sterilizată de sol. Dacă nici în acest caz nu se obține un palier, cercetătorul trebuie să caute alte fenomene care ar putea să fie implicate în studiile sale specifice; acest lucru se poate realiza prin modificări corespunzătoare ale condițiilor experimentale (temperatură, timpi de agitare, raporturi sol/soluție). Rămâne la latitudinea cercetătorului să decidă dacă să continue procedeul de testare, în ciuda unui posibil eșec în stabilirea echilibrului.

1.9.2.3. *Adsorbția pe suprafața vasului experimental și stabilitatea substanței testate*

Se pot obține date privind adsorbția substanței testate pe suprafața vaselor experimentale, precum și stabilitatea acesteia, prin analizarea probelor martor. Dacă se observă o epuizare mai mare decât eroarea standard a metodei analitice, se poate să fie implicată degradarea abiotică și adsorbția pe suprafața vasului experimental. Se poate face distincția dintre aceste două fenomene prin spălarea cu grijă a pereților vasului experimental cu un volum cunoscut dintr-un solvent potrivit și analizarea soluției de spălare pentru determinarea substanței testate. Dacă nu se observă adsorbție pe suprafața vaselor experimentale, epuizarea indică instabilitatea abiotică a substanței testate. Dacă se găsește adsorbție, este necesar ca vasul experimental să fie din alt material. Cu toate acestea, rezultatele încercării descrise anterior privind adsorbția pe suprafața vaselor experimentale nu pot fi extrapolate direct la testarea sol/soluție. Prezența solului va afecta adsorbția respectivă.

Se pot obține date suplimentare privind stabilitatea substanței testate prin determinarea bilanțului de masă original în timp. Aceasta înseamnă că se analizează faza apoasă, extractele de sol și pereții vaselor experimentale pentru determinarea substanței testate. Diferența dintre masa substanței chimice testate adăugate și suma maselor substanței chimice testate în faza apoasă, extractele de sol și de pe pereții vaselor experimentale este egală cu masa degradată și volatilizată și neextrasă. Pentru a determina bilanțul de masă, este necesar ca echilibrul de adsorbție să fi fost stabilit în timpul experimentării.

Bilanțul de masă se face pe ambele soluri și pentru un raport sol/soluție per sol care dă o epuizare de peste 20 % și, de preferință, > 50 % la echilibru. La terminarea încercării pentru găsirea raportului prin analiza ultimei probe de fază apoasă după 48 ore, fazele se separă prin centrifugare și, dacă se dorește, prin filtrare. Faza apoasă se recuperează atât cât este posibil și se adaugă solului un solvent de extracție potrivit (coeficientul de extracție de cel puțin 95 %) pentru extragerea substanței testate. Se recomandă cel puțin două extracții succesive. Se determină cantitatea de substanță din extractele din sol și de pe pereții vaselor experimentale și se calculează bilanțul de masă (*Date și raport*, ecuația 10). Dacă acesta este mai mic de 90 %, se consideră că substanța testată este instabilă pe scara timpului de testare. Cu toate acestea, studiile se mai pot continua, ținând seama de instabilitatea substanței testate; în cazul respectiv, se recomandă analizarea ambelor faze în studiul principal.

▼B

1.9.2.4. *Etapa 2 – Cinetica de adsorbție la o concentrație a substanței testate*

Se utilizează cinci soluri, selectate din tabelul 1. Este avantajoasă includerea unora sau a tuturor solurilor utilizate în studiul preliminar, dacă este cazul, printre cele cinci soluri. În cazul respectiv, pentru solurile utilizate în studiul preliminar, etapa 2 nu trebuie să se repete.

Momentul stabilirii echilibrului, raportul sol/soluție, greutatea probei de sol, volumul fazei apoase în contact cu solul și concentrația substanței testate în soluție se aleg în funcție de rezultatele studiului preliminar. Determinarea se face de preferință după aproximativ 2, 4, 6, 8 (posibil și 10) și 24 h timp de contact; timpul de agitare se poate prelungi la maximum 48 h, dacă o substanță chimică necesită un timp mai îndelungat pentru stabilirea echilibrului în privința rezultatelor încercării pentru găsirea raportului. Cu toate acestea, momentele de efectuare a determinărilor se pot stabili cu îngăduință.

Fiecare testare (un sol și o soluție) se realizează cel puțin dublu pentru a permite estimarea variației rezultatelor. Pentru fiecare testare se pregătește o probă oarbă. Aceasta conține solul și soluția de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. O probă martor care conține numai substanța testată în soluția de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune aceluiași procedeu de testare, servind drept garanție pentru situații neprevăzute.

Se calculează adsorbția în procente la fiecare moment A_{t_i} și interval de timp $A_{\Delta t_i}$ (după necesități) și se reprezintă grafic în funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de distribuție K_d la echilibru, precum și coeficientul de adsorbție normalizat cu carbon organic K_{co} (pentru substanțele chimice organice nepolare).

Rezultatele determinării cineticii de adsorbție

Valoarea K_d linear este în general exactă pentru descrierea comportamentului de sorbție în sol (35) (78) și reprezintă o expresie a mobilității inerente a substanțelor chimice în sol. De exemplu, se consideră, în general, că substanțele chimice cu $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$ sunt mobile calitativ. În mod similar, MacCall *et al*. (16) au elaborat un sistem de clasificare a mobilității în funcție de valorile K_{co}. În afară de acesta, există sisteme de clasificare a extracției prin spălare în funcție de relația dintre K_{co} și TD-50 ([1]) (32) (79).

De asemenea, conform studiilor de analiză a erorii (61), valorile K_d mai mici de $0,3\ cm^3\ g^{-1}$ nu se pot determina cu exactitate dintr-o scădere a concentrației în fază apoasă, chiar și atunci când se utilizează raportul sol/soluție cel mai favorabil (din punct de vedere al exactității), adică 1:1. Într-un asemenea caz, se recomandă analiza ambelor faze, sol și soluție.

([1]) TD-50: timpul de degradare pentru 50 % din substanța testată.

▼B

Referitor la observațiile anterioare, se recomandă ca studiul privind comportamentul de adsorbție a unei substanțe chimice în sol și posibila mobilitate a acesteia să fie continuat prin determinarea izotermelor de adsorbție Freundlich pentru sistemele respective, pentru care este posibilă o determinare exactă a K_d după protocolul de testare din prezenta metodă de testare. Este posibilă o determinare exactă, dacă valoarea care rezultă prin amplificarea K_d cu raportul sol/soluție este > 0,3, când măsurătorile au la bază scăderea concentrației în faza apoasă (metoda indirectă) sau > 0,1, când se analizează ambele faze (metoda directă) (61).

1.9.2.5. *Etapa 3 – Izotermele de adsorbție și cinetica de desorbție/izotermele de desorbție*

1.9.2.5.1. Izotermele de adsorbție

Se utilizează cinci concentrații ale substanței testate, care cuprind de preferință două ordine de mărime; în alegerea concentrațiilor respective, se ține seama de solubilitatea în apă și de concentrațiile în soluție apoasă rezultate la echilibru. Pe toată durata studiului se menține același raport sol/soluție. Testarea de adsorbție se realizează așa cum s-a descris anterior, cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată la timpul necesar pentru stabilirea echilibrului, cum s-a determinat mai înainte în etapa 2. Se determină concentrațiile la echilibru în soluție și se calculează cantitatea adsorbită din epuizarea substanței testate în soluție sau prin metoda directă. Se reprezintă grafic masa adsorbită per unitatea de masă de sol în funcție de concentrația la echilibru a substanței testate (a se vedea *Date și raport*).

Rezultatele determinării izotermelor de adsorbție

Printre modelele matematice pentru adsorbție propuse până în prezent, izoterma lui Freundlich este una utilizată frecvent pentru descrierea procesului de adsorbție. Date mai detaliate privind interpretarea și importanța modelelor de adsorbție se prezintă în bibliografie (41) (45) (80) (81) (82).

Notă: Trebuie să se menționeze că este posibilă o comparare a valorilor K_F (coeficientul de adsorbție Freundlich) pentru diferite substanțe, dacă valorile K_F respective se exprimă în aceleași unități (83).

1.9.2.5.2. Cinetica de desorbție

Scopul prezentei încercări este de a cerceta dacă o substanță chimică este adsorbită reversibil sau ireversibil pe un sol. Aceste date sunt importante, deoarece procesul de desorbție joacă un rol important și în comportamentul unei substanțe chimice în solul din teren. În plus, datele de desorbție sunt date de intrare importante în modelarea pe calculator a simulărilor pentru extracția prin spălarea și scurgerea substanțelor dizolvate. Dacă se dorește un studiu de desorbție, se recomandă să se efectueze studiul descris în continuare pentru fiecare sistem pentru care a fost posibilă o determinare exactă a K_d în testarea precedentă pentru determinarea cineticii de adsorbție.

Ca și în cazul studiului cineticii de adsorbție, există două opțiuni pentru continuarea încercării pentru determinarea cineticii de desorbție: (a) metoda paralelă și (b) metoda în serie. Alegerea metodologiei de urmat rămâne la latitudinea cercetătorului care trebuie să țină seama de dotarea și resursele laboratorului.

▼B

(a) Metoda paralelă: pentru fiecare sol care se alege pentru continuarea studiului de desorbție, se pregătesc probe cu același raport sol/soluție, în număr egal cu numărul intervalelor de timp la care se dorește să se studieze cinetica de desorbție. Este preferabil să se utilizeze aceleași intervale de timp ca în testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție; totuși, timpul total se poate prelungi, dacă este cazul, pentru ca în sistem să se stabilească echilibrul de desorbție. Pentru orice testare (un sol, o soluție) se pregătește o probă oarbă. Aceasta conține solul și soluția de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și având greutatea și respectiv volumul identice cu cele din testare. Ca probă martor, substanța testată în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (fără sol) se supune aceleași proceduri de testare. Toate amestecurile de sol cu soluție se agită până se stabilește echilibrul de adsorbție (după cum s-a stabilit anterior în etapa 2). Apoi, fazele se separă prin centrifugare și se îndepărtează fazele apoase cât se poate de mult. Volumul soluției îndepărtate se înlocuiește cu un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată și noile amestecuri se agită din nou. Faza apoasă din prima eprubetă se recuperează cât se poate de mult și se măsoară după, de exemplu, 2 h, cea din a doua eprubetă după 4 h, cea din a treia după 6 h etc., până când se realizează echilibrul de desorbție.

(b) Metoda în serie: după testarea pentru determinarea cineticii de adsorbție, amestecul este supus centrifugării și se elimină faza apoasă cât se poate de mult. Volumul de soluție îndepărtat se înlocuiește cu un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M, fără substanța testată. Noul amestec se agită până când se stabilește echilibrul de desorbție. În acest timp, la intervale egale, amestecul se supune centrifugării pentru separarea fazelor. Se analizează imediat un mic alicot de fază apoasă pentru determinarea substanței testate; apoi, testarea continuă cu amestecul original. Volumul fiecărui alicot trebuie să fie mai mic de 1 % din volumul total. Se adaugă aceeași cantitate de soluție proaspătă de $CaCl_2$ 0,01 M la amestec pentru a menține raportul sol/soluție și se continuă agitarea până la următorul interval de timp.

Se calculează desorbția, în procente, la fiecare moment (D_{t_i}) și interval de timp $(D_{\Delta t_i})$ (în funcție de necesitățile studiului) și se reprezintă grafic în funcție de timp. Se mai calculează coeficientul de desorbție K_{des} la echilibru. Toate ecuațiile aplicabile sunt date la punctul „Date și raport” și în apendicele 5.

Rezultatele încercării pentru determinarea cineticii de desorbție

Reprezentările grafice obișnuite ale desorbției D_{t_i} și adsorbției A_{t_i}, în procente, în funcție de timp, permit determinarea reversibilității procesului de adsorbție. Dacă echilibrul de desorbție se atinge chiar într-un timp dublu față de timpul necesar pentru atingerea echilibrului de adsorbție și desorbția totală este mai mare decât 75 % din cantitatea adsorbită, se consideră că adsorbția este reversibilă.

1.9.2.5.3. Izotermele de desorbție

Se determină izotermele de desorbție Freundlich pe solurile utilizate în testarea pentru izotermele de adsorbție. Testarea de desorbție se efectuează conform descrierii de la punctul „Cinetica de desorbție”, cu singura diferență că faza apoasă se analizează doar o singură dată, la echilibrul de desorbție. Se calculează cantitatea de substanță testată desorbită. Se reprezintă grafic conținutul de substanță testată, care rămâne adsorbită pe sol la atingerea echilibrul de desorbție, în funcție de concentrația la echilibru a substanței testate în soluție (a se vedea *Date și raport* și apendicele 5).

▼B

2. **DATE ȘI RAPORT**

Rezultatele analitice se prezintă sub formă de tabel (a se vedea apendicele 6). Se prezintă măsurătorile individuale și mediile calculate. Se prezintă reprezentările grafice ale izotermelor de adsorbție. Calculele se fac conform metodologiei descrise în continuare.

În sensul prezentei încercări, se consideră că greutatea pentru 1 cm^3 de soluție apoasă este 1 g. Raportul sol/soluție se poate exprima în unități de greutate/greutate sau greutate/volum cu aceeași cifră.

2.1. ADSORPȚIA

Adsorbția (A_{t_i}) se definește ca fiind cantitatea de substanță, în procente, adsorbită pe sol raportată la cantitatea prezentă la începutul încercării, în condițiile de testare. Dacă substanța testată este stabilă și nu se adsoarbe într-o măsură importantă pe pereții vasului experimental, se calculează A_{t_i} pentru fiecare moment t_i, conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \quad (3)$$

unde:

A_{t_i} = adsorbția la momentul t_i (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substanței testate adsorbite pe sol la momentul t_i (μg)

m_0 = masa substanței testate din eprubetă, la începutul încercării (μg).

Date detaliate privind modul de calcul al adsorbției A_{t_i}, în procente, pentru metodele paralelă și în serie se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de distribuție K_d este raportul dintre conținutul de substanță din faza de sol și concentrația masică de substanță în soluția apoasă, în condițiile de testare, când se stabilește echilibrul de adsorbție.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(ec)}{C_{ap}^{ads}(ec)} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{ap}^{ads}(ec)} \cdot \frac{V_0}{m_{sol}}(4) \quad (4)$$

unde

$C_s^{ads}(ec)$ = conținutul de substanță adsorbită pe sol la echilibrul de adsorbție (μg g^{-1});

$C_{ap}^{ads}(ec)$ = concentrația masică a substanței în faza apoasă la echilibrul de adsorbție (μg cm^{-3}). Concentrația respectivă se determină analitic ținând seama de valorile date de probele oarbe

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg)

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

m_{sol} = cantitatea de fază de sol, exprimată în masă uscată de sol (g)

V_0 = volumul inițial al fazei apoase în contact cu solul (cm^3.

Relația dintre A_{ec} și K_d este dată de:

$$K_d = \frac{A_{ec}}{100 - A_{ec}} \cdot \frac{V_0}{m_{sol}} \quad (5)$$

▼B

unde:

A_{ec} = adsorbția la echilibru, %

Coeficientul de adsorbție normalizată a carbonului organic K_{co} reprezintă relația dintre coeficientul de distribuție K_d și conținutul de carbon organic din proba de sol:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%CO} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

unde:

% co = procentajul de carbon organic în proba de sol (g g^{-1})

Coeficientul K_{co} reprezintă o valoare unică ce caracterizează partiția în principal a substanțelor chimice organice nepolare între carbonul organic din sol sau sediment și apă. Adsorbția substanțelor chimice respective este corelată cu conținutul organic al solidului adsorbant (7); astfel, valorile K_{co} depind de caracteristicile specifice ale fracțiilor humice care au o capacitate de sorbție foarte diferită, datorită diferențelor de origine, geneză etc.

2.1.1. **Izoterme de adsorbție**

Ecuația izotermelor de adsorbție Freundlich reprezintă relația dintre cantitatea de substanță testată adsorbită și concentrația substanței testate în soluție la echilibru (ecuația 8).

Rezultatele sunt tratate ca la „Adsorbție” și, pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță testată adsorbită pe sol după testarea de adsorbție [C_s^{ads}(ec), indicată în altă parte ca x/m]. Se consideră că echilibrul a fost stabilit și că C_s^{ads}(ec) reprezintă valoarea la echilibru:

$$C_s^{ads}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{sol}} = \frac{\left[C_0 - C_{ap}^{ads}(ec)\right].V_0}{m_{sol}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Ecuația de adsorbție Freundlich este prezentată la (8):

$$C_s^{ads}(ec) = K_F^{ads}.C_{ap}^{ads}(ec)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

sau sub formă lineară:

$$\log C_s^{ads}(ec) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{ap}^{ads}(ec) \quad (9)$$

unde:

K_F^{ads} = coeficientul de adsorbție Freundlich; se exprimă în $cm^3\ g^{-1}$, numai dacă 1/n = 1; în toate celelalte cazuri, panta 1/n se introduce în dimensiunea K_F^{ads} [$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$]

n = constanta de regresie, 1/n variază în general între 0,7-1,0, ceea ce indică faptul că rezultatele privind sorbția sunt în mod frecvent ușor nelineare.

Ecuațiile (8) și (9) sunt reprezentate grafic și se calculează valorile pentru K_F^{ads} și 1/n prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 9. Se mai calculează coeficientul de corelare r^2 al ecuației logaritmice. În figura 2 se prezintă un exemplu al acestor reprezentări grafice.

▼B

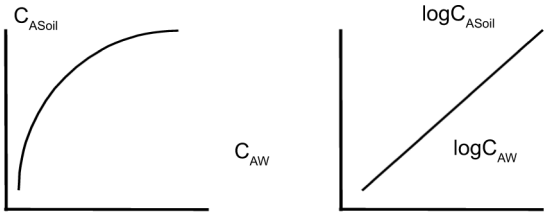


Figura 2 Reprezentarea grafică a ecuației Freundlich, normală și linearizată

2.1.2. **Bilanțul de masă**

Bilanțul de masă (BM) se definește ca procentul de substanță care se poate recupera analitic după o testare de adsorbție în funcție de cantitatea de substanță la începutul încercării.

Prelucrarea rezultatelor va fi diferită, dacă solventul este complet miscibil cu apa. În cazul solventului miscibil cu apa, se poate aplica prelucrarea datelor descrise la „Desorbție” pentru determinarea cantității de substanță recuperată prin extracția solventului. Dacă solventul este mai puțin miscibil cu apa, trebuie să se determine cantitatea recuperată.

Bilanțul de masă BM pentru adsorbție se calculează după cum urmează: se consideră că termenul (m_E) corespunde sumei maselor substanței chimice testate extrase din sol și de pe suprafața vasului experimental cu un solvent organic:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{ap}^{ads}(ec) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \quad (10)$$

unde:

BM = bilanțul de masă (%);

m_E = masa totală a substanței testate extrase din sol și de pe pereții vasului experimental în două etape (μg);

C_0 = concentrația inițială în unități de masă a soluției experimentale în contact cu solul (μg cm^{-3});

V_{rec} = volumul supernatantului recuperat după echilibrul de adsorbție (cm^{-3}).

2.2. DESORBȚIA

Desorbția (D) se definește ca fiind cantitatea de substanță testată desorbită, exprimată în procente, corelată cu cantitatea de substanță adsorbită anterior, în condițiile de testare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

unde:

D_{ti} = desorbția la momentul t_i (%);

▼B

$m_{ap}^{des}(t_i)$ = masa substanței testate desorbite din sol la momentul t_i (μg);

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței testate adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg).

Informații detaliate privind modul de calcul a desorbției D_{t_i}, în procente, pentru metodele paralelă și în serie, se prezintă în apendicele 5.

Coeficientul de desorbție aparentă (K_{des}) este, în condițiile de testare, raportul dintre conținutul de substanță ce rămâne în faza de sol și concentrația masică a substanței desorbite în soluție apoasă, când se realizează echilibrul de desorbție.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)\, V_T}{m_{ap}^{des}(ec) \qquad m_{sol}} \ (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

unde:

K_{des} = coeficientul de desorbție ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{ap}^{des}(ec)$ = masa totală a substanței testate desorbite din sol la echilibrul de desorbție (μg)

V_T = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul determinării cineticii de desorbție (cm^3

Modul de calculare a $m_{ap}^{des}(ec)$este prezentat în apendicele 5 la punctul „Desorbție”.

Observație:

Dacă testarea anterioară de adsorbție s-a realizat prin metoda paralelă, volumul V_T din ecuația 12 se consideră egal cu $V_{0.}$

2.2.1. **Izotermele de desorbție**

Ecuația pentru izotermele de desorbție Freundlich reprezintă corelația dintre conținutul de substanță testată care rămâne adsorbită pe sol și concentrația de substanță testată în soluție la echilibrul de desorbție (ecuația 16).

Pentru fiecare eprubetă, se calculează conținutul de substanță ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție cu formula următoare:

$$C_s^{des}(ec) = \frac{m_s^{ads}(ec) - m_{ap}^{des}(ec)}{m_{sol}} \ (\mu g g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{ap}^{des}(ec)$ se definește prin relația:

$$m_{ap}^{des}(ec) = m_m^{des}(ec) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{ap}^{A}(\mu g) \tag{14}$$

unde:

$C_s^{des}(ec)$ = conținutul de substanță testată ce rămâne adsorbită pe sol la echilibrul de desorbție (μg g^{-1});

$m_m^{des}(ec)$ = masa substanței determinate analitic în fază apoasă la echilibrul de desorbție (μg);

▼B

m_{ap}^{A} = masa substanței testate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$m_{ap}^{des}(ec)$ = masa substanței din soluție la echilibrul de adsorbție (μg);

$$m_{ap}^{A} = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volumul de soluție luat din eprubetă pentru determinarea substanței testate, la echilibrul de desorbție (cm^3);

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3).

Ecuația de desorbție Freundlich este prezentată în ecuația 16:

$$C_s^{des}(ec) = K_F^{des} \cdot C_{ap}^{des}(ec)^{1/n} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

sau în forma lineară:

$$\log C_s^{des}(ec) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{ap}{}^{des}(ec) \quad (17)$$

unde:

K_F^{des} = coeficientul de desorbție Freundlich;

n = constanta de regresie;

$C_{ap}^{des}(ec)$ = concentrația masică de substanță în fază apoasă la echilibrul de desorbție (μg cm^{-3}).

Ecuațiile 16 și 17 se pot reprezenta grafic și se calculează valorile pentru K_F^{des} și 1/n prin analiza de regresie cu ajutorul ecuației 17.

Observație:

Dacă exponentul 1/n al adsorbției sau desorbției Freundlich este egal cu 1, constantele de legătură (K_F^{ads} și K_F^{des}) vor fi egale cu constantele de adsorbție sau desorbție la echilibru (K_d și respectiv K_{des}) și reprezentările grafice ale C_s în funcție de C_{ap} vor fi lineare. Dacă exponenții nu sunt egali cu 1, reprezentările grafice ale C_s în funcție de C_{ap} vor fi nelineare și constantele de adsorbție și desorbție vor varia în lungul izotermelor.

2.2.2. **Raportul de testare**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

— Identificarea completă a probelor de sol utilizate, care include:

— definirea geografică a locului (latitudine, longitudine);

— data prelevării probelor;

▼B

— destinația terenului (de exemplu sol agricol, forestier etc.);

— adâncimea prelevării probelor;

— conținutul de nisip/mâl/argilă;

— valorile pH-ului (în soluție de $CaCl_2$ 0,01 M);

— conținutul de carbon organic;

— conținutul de substanțe organice;

— conținutul de azot;

— raportul C/N;

— capacitatea de schimb de cationi (mmol/kg);

— toate datele referitoare la colectarea și depozitarea probelor de sol;

— dacă este cazul, toate datele relevante pentru interpretarea adsorbției/desorbției substanței testate;

— specificarea metodelor utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;

— date privind substanța testată, dacă este cazul;

— temperatura la care s-a efectuat testarea;

— condițiile de centrifugare;

— metoda analitică utilizată pentru determinarea substanței testate;

— justificarea oricărei utilizări a agentului de solubilizare pentru pregătirea soluției mamă a substanței testate;

— explicarea corecțiilor făcute în calcule, dacă este relevant;

— rezultatele conform formularului (apendicele 6) și prezentările grafice;

— toate datele și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor încercării.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12. Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13. Calvet R., (1980) „Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, p. 83-122.

14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, p. 31-44.

15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), p. 29-35.

16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, p. 185-190.

18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J. Agric. Food Chem., 18, p. 524-528.

19. Russell M.H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, p. 901-932.

▼B

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22. Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), „Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, p. 269-273.

23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, p. 45-52.

24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.

25. Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, p. 247-258.

26. Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 143-154.

27. Hamaker J.W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), p. 135-172, Plenum Press, NY.

28. Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, p. 732-210.

29. Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, p. 49-143.

30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, p. 37-44.

31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D.I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.

33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, p. 340-350.

34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, p. 389-395.

35. Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), „Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, p. 80-101,

36. Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, p. 572-576.

▼B

37. Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. J. Agri. Food Chem., 17, p. 667-668.

38. Briggs G.G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. Nature, 223, p. 1288.

39. Briggs G.G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

40. Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. J. Agric. Food Chem., 32, p. 243-246.

41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. Residue Rev., 32, p. 29-92.

42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

43. Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere 10, p. 833-846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, p. 1-17.

45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). „Adsorption in organic chemicals” in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, p. 49-143.

46. Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. Weed Science, Vol. 23, p. 454-457.

48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

51. Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

53. ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc., 34, p. 353-354.

60. Grover R., and Hance R.J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., p. 109-138.

61. Boesten, J.J.T.I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

62. Boesten, J.J.T.I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, p. 227-231.

64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), p. 382-386.

65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), p. 227-231.

66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), p. 297-312.

67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), p. 109-116.

68. Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, *et al.*), p. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. Science, Vol. 206, p. 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, p. 38-42.

72. Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere, Vol. 10(8), 833-846.

73. Moreale A., van Bladel R., (1981), “Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité. Revue de l’Agric., 34 (4), p. 319-322.

74. Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), p. 1373-1384.

76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), “HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), p. 2341-2352.

77. Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, p. 29-36.

78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

80. Giles C.H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.

81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. J. Chem. Soc., 3973-93.

82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l’adsorption”. Ann. Agron. 31: 239-251.

83. Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

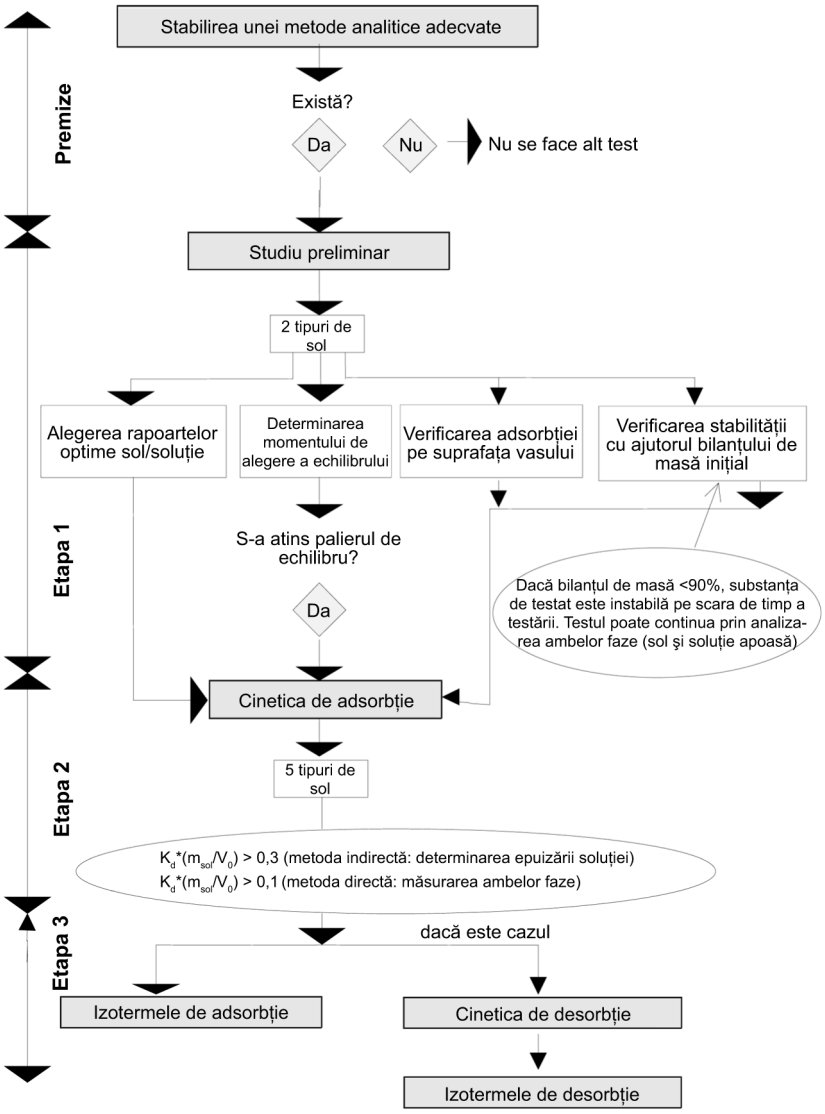
84. Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Apendicele 1

Protocolul testului



▼B

Apendicele 2

INFLUENȚA PRECIZIEI METODEI ANALITICE ȘI A VARIAȚIEI CONCENTRAȚIEI ASUPRA PRECIZIEI REZULTATELOR PRIVIND ADSORBȚIA

Din tabelul prezentat în continuare (84), este evident că atunci când diferența dintre masa inițială (m_0 = 110 µg) și masa la echilibru [$m_{ap}^{ads}(ec)$ = 100 µg] a substanței testate în soluție este foarte mică, o eroare de 5 % la măsurarea concentrației la echilibru conduce la o eroare de 50 % în calculul masei de substanță adsorbită în sol [$m_s^{ads}(ec)$] și de 52,4 % în calculul K_d.

Cantitatea de sol m_{sol} = 10 g

Volumul soluției V_0 = 100 cm^3

	$m_{ap}^{ads}(ec)$ (µg)	$C_{ap}^{ads}(ec)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(ec)$* (µg)	$C_s^{ads}(ec)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PENTRU A = 9 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	valoarea reală	10	1,00	valoarea reală	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PENTRU A = 55 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valoarea reală	60,0	6,00	valoarea reală	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PENTRU A = 99 %							
m_0 = 110 µg sau C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valoarea reală	108,9	10,89	valoarea reală	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

unde:

$*m_s^{ads}(ec) = m_0 - m_{ap}^{ads}(ec), C_s^{ads}(ec) = \frac{[C_0 - C_{ap}^{ads}(ec)]V_0}{m_{estimat}}. Kd = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_{ap}^{ads}(ec)} \frac{V_0}{m_{estimat}}$

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței testate în faza de sol la echilibru, µg

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței testate în faza apoasă la echilibru, µg

$C_s^{ads}(ec)$ = conținutul de substanță testată în faza de sol la echilibru, µg g^{-1}

$C_{ap}^{ads}(ec)$ = concentrația masică a substanței încercate în faza apoasă la echilibru, µg cm^{-3}

R = eroarea analitică în determinarea $m_{ap}^{ads}(ec)$;

R‡ = eroarea calculată datorită erorii analitice R.

▼B

Apendicele 3

METODE DE ESTIMARE PENTRU K_d

1. Metodele de estimare permit estimarea K_d din corelațiile cu, de exemplu, valorile P_{ow} (12) (39) (63)-(68), datele privind solubilitatea apei (12) (19) (21) (39) (68-73) sau datele privind polaritatea, rezultate din aplicarea HPLC (cromatografia lichidă de înaltă performanță) la faza inversată (74-76). Conform celor prezentate în tabelele 1 și 2, K_{co} sau K_{so} se calculează din ecuațiile menționate și, apoi, K_d se calculează indirect din ecuațiile următoare:

$$K_{co} = K_d \cdot \frac{100}{\%co}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{os} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%co}(cm^3 g^{-1})$$

2. Concepția corelațiilor prezentate are în vedere două ipoteze: (1) adsorbția și desorbția sunt influențate în principal de substanța organică din sol și (2) interacțiunile implicate sunt în principal nepolare. Ca urmare, corelațiile de acest tip: (1) nu se pot aplica sau se pot aplica într-o anumită măsură la substanțele polare și (2) nu se pot aplica pentru un conținut foarte mic de substanță organică în sol (12). În afară de aceasta, deși s-au găsit corelații satisfăcătoare între P_{ow} și adsorbție (19), nu se poate spune același lucru pentru relația dintre solubilitatea apei și gradul de adsorbție (19) (21); până în prezent, studiile sunt foarte contradictorii.

3. În tabelele 1 și 2 se prezintă câteva exemple de corelații între coeficientul de adsorbție și coeficientul de partiție octanol-apă și respectiv solubilitatea în apă.

Tabelul 1

Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și coeficientul de partiție octanol-apă; pentru alte exemple, a se vedea referințele 12 și 68

Substanțe	Corelații	Autori
Urei substituite	$\log K_{so} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Clorurate aromate	$\log K_{co} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
Diferite pesticide	$\log K_{so} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl și Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarburi aromate	$\log K_{co} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles și Mantoura (1987) (67)

Tabelul 2

Exemple de corelație între coeficientul de distribuție a adsorbției și solubilitatea în apă; pentru alte exemple, a se vedea referințele 68 și 69

Substanțe	Corelații	Autori
Diferite pesticide	$\log K_{so} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_a$	Gerstl și Mingelgrin (1984) (66)
Substanțe clorurate aromate, alifatice	$\log K_{so} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_a$	Chiou *et al.* (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{co} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_a$	Hasset *et al.* (1981) (71)
Substanțe aromate, alifatice ciclice	$\log K_{co} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_a - 0{,}00953 (mp-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Compuși diverși	$\log K_{so} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_a$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Apendicele 4

CALCULE PENTRU STABILIREA CONDIȚIILOR DE CENTRIFUGARE

1. Timpul de centrifugare se obține cu formula următoare, considerând că particulele sunt sferice:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2(\rho_s - \rho_{ap})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Pentru simplificare, toți parametrii se exprimă în unități non-SI (g, cm).

unde:

ω = viteza rotațională (= 2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = rotații pe minut

η = vâscozitatea soluției, g s^{-1} cm_{-1}

r_p = raza particulei, cm

ρ_s = densitatea solului, g cm^{-3}

ρ_{ap} = densitatea soluției, g cm^{-3}

R_t = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la suprafața soluției din eprubeta din centrifugă, cm

R_b = distanța de la centrul rotorului centrifugei până la fundul eprubetei din centrifugă, cm

$R_b - R_t$ = lungimea amestecului sol/soluție în eprubeta din centrifugă, cm

În practică, se utilizează dublul timpilor calculați pentru a asigura separarea completă.

2. Ecuația (1) se mai poate simplifica, dacă se consideră că vâscozitatea (η) și densitatea (ρ_{ap}) soluției sunt egale cu vâscozitatea și densitatea apei la 25 °C; astfel, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} și $\rho_{ap} = 1{,}0$ g cm^{-3}.

Atunci, timpul de centrifugare se obține cu ecuația (2):

$$t = \frac{3{,}7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{R_b}{R_t} \qquad (2)$$

3. Din ecuația 2 se vede că doi parametri sunt importanți pentru stabilirea condițiilor de centrifugare, adică timpul (t) și viteza (rpm), pentru a realiza separarea particulelor cu o anumită dimensiune (în cazul nostru cu raza de 0,1 μm): (1) densitatea solului și (2) lungimea amestecului în eprubeta din centrifugă ($R_b - R_t$), adică distanța parcursă de particula de sol de la suprafața soluției până la fundul eprubetei; evident, pentru un volum stabilit, lungimea amestecului din eprubetă va depinde de pătratul razei eprubetei din centrifugă.

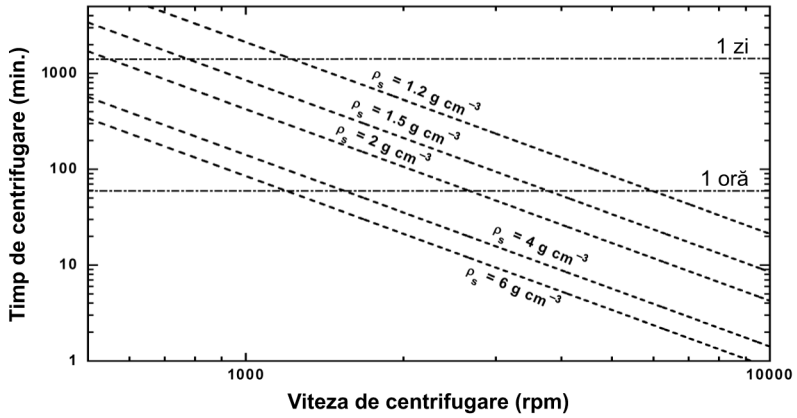
4. Figura 1 prezintă variațiile timpului de centrifugare (t) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) la diferite densități ale solului (ρ_s) (figura 1a) și diferite lungimi ale amestecului din eprubetele din centrifugă (figura 1b). Din figura 1a, este evidentă influența densității solului; de exemplu, pentru o centrifugare clasică de 3 000 rpm, timpul de centrifugare este de aproximativ 240 minute pentru o densitate a solului de 1,2 g cm^3, și de numai 50 minute pentru o densitate a solului de 2,0 g cm^3. În mod similar, din figura 1b, pentru o centrifugare clasică de 3 000 rpm timpul este de 50 minute pentru o lungime a amestecului de 10 cm și de numai 7 minute pentru o lungime de 1 cm. Cu toate acestea, este important să se găsească o relație optimă între centrifugare, care necesită o lungime cât se poate mai mică și ușurința manipulării de către executant la separarea fazelor după centrifugare.

▼B

5. În plus, la stabilirea condițiilor experimentale pentru separarea fazelor sol/soluție, este important să se ia în considerație posibilitatea existenței unei a treia „pseudo-faze”, coloizii. Particulele de acest tip, cu o dimensiune mai mică de 0,2 μm, pot să aibă un impact important asupra întregului mecanism de adsorbție a unei substanțe într-o suspensie de sol. Atunci când centrifugarea se realizează ca în descrierea anterioară, coloizii rămân în faza apoasă și se analizează împreună cu faza apoasă. Astfel, datele privind impactul acestora se pierd.

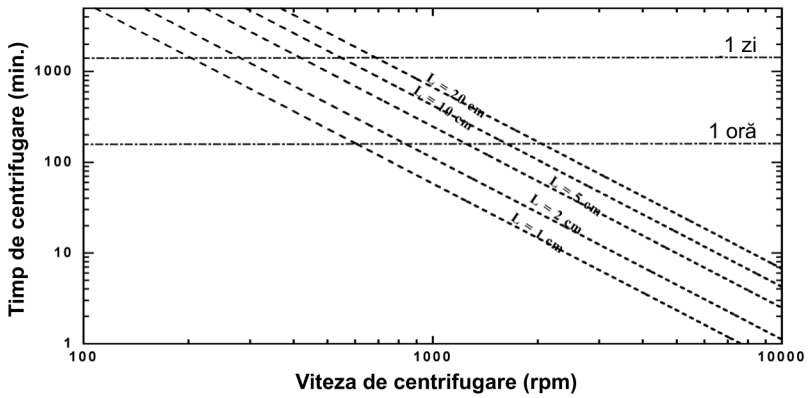
   Dacă laboratorul executant posedă dispozitive de ultracentrifugare sau ultrafiltrare, ar putea fi posibil un studiu mai aprofundat al fenomenului de adsorbție/desorbție al unei substanțe în sol, care să includă date privind adsorbția substanței pe coloizi. În cazul respectiv, se aplică o ultracentrifugare la 60 000 rpm sau o ultrafiltrare cu un filtru cu porozitatea de 100 000 daltoni pentru separarea celor trei faze: sol, coloizi, soluție. Este necesar ca și protocolul testului să se modifice corespunzător, pentru ca la toate cele trei faze să se analizeze substanța.

Figura 1a.



Variațiile timpului de centrifugare (t) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite densități ale solului (ρ_s). R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$g s^{-1} cm^{-1} și ρ_{ap} = 1,0 g cm^{-3} la 25 °C.

Figura 1b.



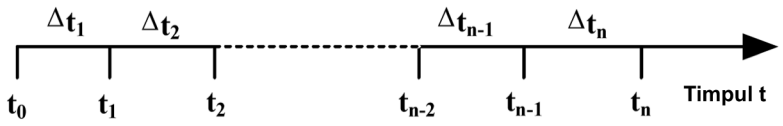
Variațiile timpului de centrifugare (t) în funcție de viteza de centrifugare (rpm) pentru diferite lungimi ale amestecului în eprubeta din centrifugă ($R_b - R_t$)= L; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{ap} = 1,0 g cm^{-3} la 25 °C și ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Apendicele 5

CALCULUL ADSORBȚIEI A (%) ȘI DESORBȚIEI D (%)

Diagrama timpului procedeului este:



În toate calculele se consideră să substanța testată este stabilă și nu se adsoarbe semnificativ pe pereții recipientului.

ADSORBȚIA A (A %)

(a) *Metoda paralelă*

Adsorbția, în procente, se calculează pentru fiecare eprubetă (i) și pentru fiecare moment (t_i), conform ecuației:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Termenii ecuației anterioare se pot calcula după cum urmează:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s{}^{ads}(t_i) = m_0 - C_{ap}{}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

unde:

A_{ti} = adsorbția în procente (%) la momentul t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa substanței testate pe sol la timpul t_i la care se efectuează analiza (μg);

m_0 = masa substanței testate din eprubetă, la începutul încercării (μg);

C_0 = concentrația masică inițială a substanței din soluția de testare în contact cu solul (μg cm^{-3});

▼B

$C_{ap}^{ads}(t_i)$ = concentrația masică a substanței în faza apoasă la timpul t_i la care se realizează analiza (µg cm^{-3}); concentrația respectivă se determină analitic, ținând seama de valorile oferite de probele oarbe;

V_0 = volumul inițial al soluției testate în contact cu solul (cm^3).

Valorile adsorbției, în procente, A_{t_i} sau $C_{ap}^{ads}(t_i)$ se reprezintă grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de sorbție. Exemple cu aceste reprezentări grafice se prezintă în figurile 1 și, respectiv, 2.

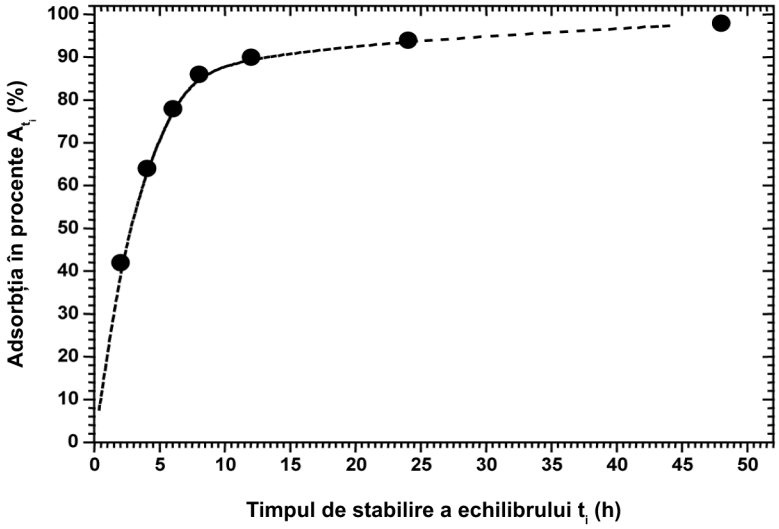


Figura 1

Reprezentarea grafică a echilibrului de adsorbție

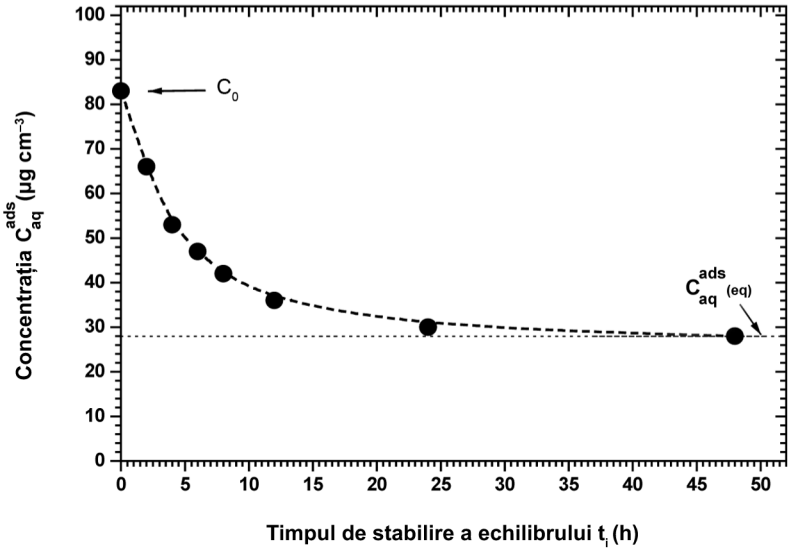


Figura 2

Concentrația masică a substanței testate în fază apoasă (C_{ap}) în funcție de timp

▼B

(b) *Metoda în serie*

Ecuațiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției se realizează prin măsurători ale substanței testate în mici alicoți de fază apoasă la anumite intervale de timp.

— În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță adsorbită pe sol, după cum urmează:

— pentru primul interval de timp $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— pentru al doilea interval de timp $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— pentru al treilea interval de timp $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— pentru al n-lea interval de timp $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorbția, în procente, la fiecare interval de timp, $A_{\Delta t_i}$, se calculează cu ecuația următoare:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

în timp ce adsorbția, în procente, (A_{t_i}) la momentul t_i se obține cu ecuația:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Valorile adsorbției A_{t_i} sau $A_{\Delta t_i}$ (în funcție de necesitățile studiului) se reprezintă grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul sorbției.

— La momentul echilibrului t_{ec}:

— masa substanței testate adsorbite pe sol este:

$$m_s^{ads}(ec) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— masa substanței testate în soluție este:

$$m_{ap}^{ads}(ec) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— și adsorbția, în procente, la echilibru este:

$$A_{ec} = \frac{m_s^{ads}(ec)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Parametrii din ecuațiile anterioare se definesc după cum urmează:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masa substanței adsorbite pe sol în intervalele de timp Δt_1, Δt_2,… și respectiv Δt_n (μg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masa substanței, măsurată într-un alicot v_a^A în momentele t_1, t_2,…, respectiv t_n (μg)

$m_s^{ads}(ec)$ = masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție (μg)

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

v_a^A = volumul alicotului în care se măsoară substanța testată (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = adsorbția, în procente, ce corespunde la un interval de timp Δt_i (%)

A_{ec} = adsorbția, în procente, la echilibrul de adsorbție (%)

DESORBȚIA D (%)

Timpul t_0, la care începe proba pentru cinetica de desorbție, se consideră ca momentul în care volumul maxim recuperat de soluție a substanței testate (după atingerea echilibrului de adsorbție) este înlocuit de un volum egal de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M.

(a) *Metoda paralelă*

La momentul t_i, se măsoară masa substanței testate în faza apoasă luată din eprubeta i V_r^i și masa desorbită se calculează conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{ap}^{A} \quad (13)$$

La echilibrul de desorbție $t_i = t_{ec}$ și, prin urmare, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Masa substanței testate desorbite într-un interval (Δt_i) este dată de ecuația:

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_i) = m_{ap}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{ap}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorbția, în procente, se calculează:

la momentul t_i din ecuația:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

și în intervalul de timp (Δt_i) din ecuația:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

unde:

D_{ti} = desorbția, în procente, la momentul t_i (%)

$D_{\Delta ti}$ = desorbția, în procente, care corespunde unui interval Δt_i (%)

$m_{ap}^{des}(t_i)$ = masa substanței testate desorbite la momentul t_i, (μg)

$m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$ = masa substanței testate desorbite în intervalul de timp Δt_i (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masa substanței testate măsurate analitic la timpul t_i într-un volum de soluție V_r^i, care se ia pentru analiză (μg)

$m_{ap}{}^{A}$ = masa substanței testate rămase de la echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$$m_{ap}^{A} = m_{ap}^{ads}(ec) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{ap}^{ads}(ec)$ = masa substanței testate în soluție la echilibrul de adsorbție (μg)

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit de același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

V_r^i = volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței testate, în proba pentru cinetica desorbției (cm^3)

Valorile desorbției D_{ti} sau $D_{\Delta t_i}$(în funcție de necesitățile studiului) sunt reprezentate grafic în funcție de timp și se determină timpul după care se atinge echilibrul de desorbție.

(b) *Metoda în serie*

Ecuațiile prezentate în continuare țin seama de faptul că determinarea adsorbției, care a avut loc anterior, s-a realizat prin măsurarea substanței testate în alicoți mici (v_a^A) de fază apoasă (metoda în serie de la punctul 1.9 Realizarea încercării). Se consideră că: (a) volumul de supernatant scos din eprubetă după proba pentru determinarea cineticii de adsorbție a fost înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R) și (b) volumul total al fazei apoase în contact cu solul (V_T) în timpul probei pentru determinarea cineticii de desorbție rămâne constant și este dat de ecuația:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

La momentul t_i:

— masa substanței testate se măsoară într-un alicot mic (v_a^D) și se calculează masa desorbită, conform ecuației:

$$m_{ap}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— la echilibrul de desorbție $t_i = t_{ec}$ și prin urmare $m_{ap}^{des}(t_i) = m_{ap}^{des}(ec)$.

— desorbția D_{t_i}, în procente, se calculează din ecuația următoare:

$$D_{t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

La un interval de timp (Δt_i):

În fiecare interval de timp, se calculează cantitatea de substanță desorbită după cum urmează:

— pentru primul interval de timp $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^{A} \text{ și } m_s^{des}(t_1) = m_s^{ap}(ec) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1 \quad (21)$$

— pentru al doilea interval de timp $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{ap}^{A} \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right)$$

și

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(ec) - \left[m_{ap}^{des}(\Delta t_1) + m_{ap}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— pentru al n-lea interval de timp $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{ap}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{ap}^{A} \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{ap}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(ec) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n} m_{ap}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

În sfârșit, desorbția, în procente, la fiecare interval de timp, $D_{\Delta t_i}$, se calculează cu următoarea ecuație:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{ap}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

în timp ce desorbția, în procente, D_{t_i} la momentul t_i este dată de ecuația:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{ap}^{des}(j)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100 = \frac{m_{ap}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(ec)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

unde parametrii utilizați anterior se definesc după cum urmează:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masa substanței adsorbite în continuare pe sol după intervalele de timp Δt_1, Δt_2, …, respectiv Δt_n (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masa substanței desorbite în intervalele de timp Δt_1, Δt_2, …, respectiv Δt_n (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = masa substanței măsurată într-un alicot (v_a^D) la momentele t_1, t_2, …, respectiv t_n (μg)

V_T = volumul total al fazei apoase în contact cu solul în timpul probei de cinetică a desorbției efectuate prin metoda în serie (cm^3)

$m^A{}_{ap}$ = masa substanței testate rămase de la echilibrul de desorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului (μg)

$$m_{ap}^{A} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{ap}^{ads}(ec) \quad (26)$$

V_R = volumul supernatantului scos din eprubetă după atingerea echilibrului de adsorbție și înlocuit cu același volum de soluție de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3)

v_a^D = volumul alicotului luat pentru analiză din eprubeta (i) în timpul probei pentru cinetica desorbției realizate prin metoda în serie (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

Apendicele 6

ADSORBȚIA – DESORBȚIA ÎN SOL: FORMULARE PENTRU RAPORTAREA DATELOR

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Parametrii determinați prin metoda de analiză

Solul cântărit	g	
Sol: substanța uscată	g	
Volumul soluție de $CaCl_2$	cm^3	
Concentrația nominală a soluției finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentrația analitică a soluției finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Principiul metodei analitice utilizate:

Etalonarea metodei analitice:

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitică urmată: Indirectă ☐ Paralelă ☐ În serie ☐

Directă ☐

Testarea de adsorbție: eșantioanele

	Simbol	Unități	Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului	
Nr. de eprubete										
Solul cântărit	—	g								
Solul: substanța uscată	m_{sol}	g								
Volumul apei din solul cântărit (calculat)	V_{AS}	cm^3								
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		cm^3								
Volumul soluției mamă		cm^3								
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	V_0	cm^3								
Concentrația inițială a soluției experimentale	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masa substanței testate la începutul încercării	m_0	µg								

▼B

	Simbol	Unități	Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului		Timpul de stabilire a echilibrului	
După agitare și centrifugare										
METODA INDIRECTĂ										
Metoda paralelă										
Concentrația substanței testate în fază apoasă, inclusiv corecția probei martor	$C_{ap}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Metoda în serie										
Masa măsurată a substanței testate în alicot V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
METODA DIRECTĂ										
Masa substanței testate adsorbite pe sol	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Calculul adsorbției										
Adsorbția	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Mijloacele										
Coeficientul de adsorbție	K_d	µg cm^{-1}								
Mijloacele										
Coeficientul de adsorbție	K_{co}	µg cm^{-1}								
Mijloacele										

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Testarea de adsorbție: probe oarbe și martor

	Simbol	Unități	Proba oarbă		Proba oarbă		Proba martor	
Nr. de eprubete								
Solurile cântărite		g					0	0
Volumul apei din solul cântărit (calculat)		cm^3					—	—
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M adăugate		cm^3						
Volumul soluției mamă de substanță testată adăugată		cm^3	0	0				
Volumul total al fazei apoase (calculat)		cm^3					—	—

▼B

	Simbol	Unități	Proba oarbă		Proba oarbă		Proba martor	
Concentrația inițială a substanței testate în fază apoasă		μg cm^{-3}						
După agitare și centrifugare								
Concentrația în fază apoasă		μg cm^{-3}						

Observație: Dacă este necesar, se adaugă coloane.

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Bilanțul de masă

	Simbol	Unități				
Nr. de eprubete						
Solul cântărit	—	g				
Solul: substanța uscată	m_{sol}	g				
Volumul apei în solul cântărit (calculat)	V_{AS}	ml				
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		ml				
Volumul soluției mamă		cm^3				
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	V_0	cm^3				
Concentrația inițială a soluției experimentale	C_0	μg cm^{-3}				
Timpul de realizare a echilibrului	—	h				
După agitare și centrifugare						
Concentrația substanței testate în faza apoasă la adsorbție, inclusiv corecția probei oarbe la echilibru	$C_{ap}^{ads}(ec)$	μg cm^{-3}				
Timpul de realizare a echilibrului	t_{ec}	h				
Prima diluție cu solvent						
Volumul fazei apoase îndepărtate	V_{rec}	cm^3				
Volumul de solvent adăugat	ΔV	cm^3				
Prima extracție cu solvent						
Semnalul analizat în solvent	S_{EI}	var.				
Concentrația substanței testate în solvent	C_{EI}	μg cm^{-3}				

▼B

	Simbol	Unități				
Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor	m_{EI}	µg				
A doua diluție cu solvent						
Volumul de solvent îndepărtat	ΔV_s	cm^3				
Volumul de solvent adăugat	$\Delta V'$	cm^3				
A doua extracție cu solvent						
Semnalul analizat în solvent	S_{E2}	var.				
Concentrația substanței testate în solvent	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Masa substanței extrase din sol și de pe pereții vaselor	m_{E2}	µg				
Masa totală a substanței testate extrase în două etape	m_E	µg				
Bilanțul de masă	BM	%				

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Izotermele de adsorbție

	Simbol	Unități								
Nr. de eprubete										
Solul cântărit	—	g								
Solul; substanță uscată	E	g								
Volumul de apă din solul cântărit (calculat)	V_{AS}	cm^3								
Volumul soluției de $CaCl_2$ 0,01 M pentru a aduce solul la echilibru		cm^3								
Volumul soluției mamă adăugat		cm^3								
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul (calculat)	V_0	cm^3								
Concentrația soluției	C_0	µg cm^{-3}								
Timpul de realizare a echilibrului	—	h								

▼B

	Simbol	Unități								
După agitare și centrifugare										
Concentrația substanței în faza apoasă, inclusiv corecția probei oarbe	$C_{ap}^{ads}(ec)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Masa adsorbită per unitatea de sol	$C_s^{ads}(ec)$	µg g^{-1}								

Analiza de regresie:

valoarea K_f^{ads}:

valoarea l/n:

coeficientul de regresie r^2:

Substanța testată:

Solul testat:

Conținutul de substanță uscată din sol (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitică urmată: Indirectă ☐ Paralelă ☐ În serie ☐

Testarea de desorbție

		Simbol	Unități	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp
Nr. de eprubete ce vin de la etapa de adsorbție							
Masa substanței adsorbite pe sol la echilibrul de adsorbție		$m_s^{ads}(ec)$	µg				
Volumul fazei apoase îndepărtate, înlocuit cu soluție de $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volumul total al fazei apoase în contact cu solul	MP	V_0	cm^3				
	MS	V_T	cm^3				
Masa substanței testate rămase după echilibrul de adsorbție datorită înlocuirii incomplete a volumului		m_{ap}^A	µg				
Cinetica desorbției							
Masa măsurată a substanței desorbite din sol la momentul t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volumul soluției luate din eprubeta (i) pentru măsurarea substanței testate	MP	V_r^i	cm^3				
	MS	V_a^D	cm^3				
Masa substanței desorbite din sol la momentul t_i (calculată)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Masa substanței desorbite din sol în intervalul de timp Δt_i (calculată)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbol	Unități	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp	Interval de timp
Desorbția în procente						
Desorbția la momentul t_i	D_{t_i}	%				
Desorbția în intervalul de timp Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coeficientul de desorbție aparent	K_{des}					

MP: Metoda paralelă

MS: Metoda în serie

▼B

C.19. ESTIMAREA COEFICIENTULUI DE ADSORBȚIE (K_{CO}) PE SOL ȘI NĂMOL DE EPURARE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC)

1. METODĂ

Prezenta metodă este identică cu cea prevăzută în Orientarea 21 (2000) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Comportarea la sorbție a substanțelor din soluri și nămolurile de epurare se poate descrie cu ajutorul parametrilor determinați experimental prin metoda de testare C.18. Un parametru important este coeficientul de adsorbție care reprezintă raportul dintre concentrația substanței din sol/nămol și concentrația substanței în fază apoasă la echilibrul de adsorbție. Coeficientul de adsorbție normalizat la conținutul de carbon organic al solului K_{co} este un indicator util al capacității de fixare a unei substanțe chimice pe o substanță organică din sol și din nămolul de epurare și permite compararea diferitelor substanțe chimice. Parametrul menționat se poate estima prin corelări cu solubilitatea apei și coeficientul de partiție n-octanol/apă (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Metoda experimentală descrisă în prezenta testare utilizează HPLC pentru estimarea coeficientului de adsorbție K_{co} în sol și în nămolul de epurare (8). Estimările prezintă o credibilitate mai mare decât cele din calculele de relație cantitativă structură-activitate [RCSA (QSAR)] (9). Ca metodă de estimare, aceasta nu poate înlocui în întregime încercările de realizare a echilibrului probelor utilizate în metoda de testare C.18. Cu toate acestea, K_{co} estimat poate fi util în alegerea parametrilor optimi de testare pentru studiile de adsorbție/desorbție conform metodei de testare C.18, prin calcularea K_d (coeficientul de distribuție) sau K_f (coeficientul de adsorbție Freundlich) conform ecuației 3 (punctul 1.2).

1.2. DEFINIȚII

K_d: Coeficientul de distribuție este raportul dintre concentrațiile la echilibru, C, ale unei substanțe testate dizolvate într-un sistem bifazic ce conține un adsorbant (sol sau nămol de epurare) și o fază apoasă; este o valoare adimensională atunci când concentrațiile în ambele faze se exprimă în greutate/greutate. Pentru concentrația în faza apoasă exprimată în greutate/volum, unitățile sunt $ml \cdot g^{-1}$. K_d poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului și poate să fie dependent de concentrație.

$$K_d = \frac{C_{sol}}{C_{ap}} \; sau \; \frac{C_{nămol}}{C_{ap}} \qquad (1)$$

unde:

C_{sol} = concentrația substanței testate în sol la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$)

$C_{nămol}$ = concentrația substanței testate în nămol la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{ap} = concentrația substanței testate în faza apoasă la echilibru ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

▼B

K_f: Coeficientul de adsorbție Freundlich este concentrația substanței testate în sol sau nămolul de epurare (x/m) atunci când concentrația la echilibru, C_{ap}, în faza apoasă este egală cu unu; unitățile sunt μg g^{-1} adsorbant. Valoarea poate să varieze în funcție de proprietățile adsorbantului.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{ap} \quad (2)$$

unde:

x/m = cantitatea de substanță testată x (μg) adsorbită pe cantitatea de adsorbant m (g) la echilibru

1/n = panta izotermei de adsorbție Freundlich

C_{ap} = concentrația substanței testate în fază apoasă la echilibru (μg · ml^{-1}).

Pentru $C_{ap} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{co}: Coeficientul de distribuție (K_d) sau coeficientul de adsorbție Freundlich (K_f) normalizat la conținutul de carbon organic (f_{co}) al adsorbantului; în special pentru substanțele chimice neionizate, este un indicator aproximativ al gradului de adsorbție între o substanță și adsorbant și permite compararea diferitelor substanțe chimice. În funcție de dimensiunile K_d și K_f, K_{co} poate să fie adimensional sau să aibă unitățile ml g^{-1} sau μg g^{-1} substanță organică.

$$K_{co} = \frac{K_d}{f_{co}} \text{ (adimensional sau ml} \cdot g^{-1}\text{) sau } \frac{K_f}{f_{co}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Relația dintre K_{co} și K_d nu este liniară întotdeauna și, prin urmare, valorile K_{co} pot să varieze de la un sol la altul, dar gradul de variație a acestora este redus în mare măsură în comparație cu valorile K_d sau K_f.

Coeficientul de adsorbție (K_{co}) se obține din factorul de capacitate (k'), utilizând o curbă de etalonare obținută prin reprezentarea grafică a log k' în funcție de log K_{co} pentru compușii de referință selectați.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

unde:

t_g = timpul de retenție HPLC pentru testare și substanța de referință (minute)

t_0 = timpul mort HPLC (minute) (a se vedea punctul 1.8.2).

P_{ow}: Coeficientul de partiție octanol-apă reprezintă raportul dintre concentrațiile substanței dizolvate în n-octanol și apă; este o mărime adimensională.

$$Pow = \frac{C_{octanol}}{C_{ap}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Înaintea utilizării metodei, este necesar să se cunoască formula structurală, puritatea și constanta de disociere (dacă este cazul). Sunt utile datele privind solubilitatea în apă și solvenți organici, coeficientul de partiție octanol-apă și caracteristicile hidrolizei.

▼B

Pentru a corela datele de retenție HPLC măsurate pentru o substanță testată cu coeficientul de adsorbție al acesteia K_{co}, trebuie să se reprezinte grafic curba de etalonare pentru log K_{co} în funcție de log k'. Trebuie să se utilizeze cel puțin șase puncte, cel puți unul peste și unul sub valoarea preconizată pentru substanța testată. Acuratețea metodei este mult îmbunătățită, dacă se utilizează substanțe de referință cu structura asemănătoare cu a substanței testate. Dacă astfel de date nu sunt disponibile, este la latitudinea utilizatorului să aleagă substanțele de etalonare potrivite. În acest caz, este necesar să se aleagă un set mai general de substanțe eterogene din punct de vedere structural. Substanțele și valorile K_{co} care se pot utiliza sunt prezentate în apendice, în tabelul 1 pentru nămolul de epurare și în tabelul 3 pentru sol. Alegerea altor substanțe de etalonare se justifică.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

HPLC se realizează pe o coloană analitică umplută cu o fază solidă de cianopropil care se comercializează și care conține grupe liofile și polare. Se utilizează o fază staționară polară din matrice de silice.

- O - Si	- CH_2 - CH_2 - CH_2	- CN
silice	distanțier nepolar	grupă polară

Principiul metodei de testare este similar cu cel al metodei de testare A.8 (coeficientul de partiție, metoda HPLC). Când trece prin coloană în lungul fazei mobile, substanța testată interacționează cu faza staționară. Ca urmare a partiției dintre faza mobilă și cea staționară, substanța testată este întârziată. Compoziția dublă a fazei staționare, care are porțiuni polare și nepolare, permite interacțiunea grupelor polare și nepolare dintr-o moleculă într-un mod similar cu cel pentru substanța organică din matricele de sol sau nămol de epurare. Aceasta permite stabilirea relației dintre timpul de retenție pe coloană și coeficientul de adsorbție pe substanța organică.

pH-ul are o influență importantă în mod deosebit asupra comportamentului de sorbție al substanțelor polare. Pentru solurile agricole sau rezervoarele stațiilor de tratare a apelor reziduale, pH-ul variază de obicei între 5,5 și 7,5. Pentru substanțele ionizabile, trebuie să se efectueze două testări, atât cu forma ionizată, cât și cu cea neionizată în soluții tampon corespunzătoare, dar numai pentru situațiile în care cel puțin 10 % din compusul testat se disociază între valorile pH-ului 5,5-7,5.

Deoarece pentru evaluare se utilizează doar relația dintre retenția pe coloana HPLC și coeficientul de adsorbție, nu este necesară o metodă analitică cantitativă, ci doar determinarea timpului de retenție. Dacă este disponibil un set corespunzător de substanțe de referință și se pot utiliza condițiile de testare standard, metoda oferă un mod rapid și eficient pentru estimarea coeficientului de adsorbție K_{co}.

1.5. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda HPLC se poate aplica substanțelor chimice (nemarcate și marcate) pentru care există un sistem corespunzător de detecție (de exemplu spectrofotometru, detector de radioactivitate) și care sunt suficient de stabile în timpul testării. Această metodă poate să fie deosebit de utilă pentru substanțele chimice dificil de studiat în alte sisteme experimentale (adică substanțele volatile; substanțe care nu sunt solubile în apă la o concentrație care să poată fi măsurată analitic; substanțe cu afinitate mare pentru suprafața sistemelor de incubare). Metoda se poate utiliza la amestecurile care dau benzi de eluție neseparate. În acest caz, este necesar să se stabilească limitele superioară și inferioară ale valorilor log K_{co} pentru compușii amestecului testat.

▼B

Impuritățile pot să creeze uneori probleme în interpretarea rezultatelor HPLC, dar sunt de importanță minoră atâta timp cât substanța testată se poate identifica și separa analitic în mod clar de impurități.

Metoda este validată pentru substanțele prezentate în tabelul 1 din apendice și a fost de asemenea aplicată pentru o serie de alte substanțe din următoarele clase de substanțe chimice:

— amine aromate (de exemplu trifluralin, 4-cloroanilină, 3,5-dinitroanilină, 4-metlanilină, N-metilanilină, 1-naftilamină), esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic;

— esteri ai acizilor carboxilici aromați (de exemplu esterul metilic al acidului benzoic, esterul etilic al acidului 3,5-dinitrobenzoic);

— hidrocarburi aromate (de exemplu toluen, xilen, etilbenzen, nitrobenzen);

— esteri ai acizilor ariloxifenoxipropionici (de exemplu metil-diclofop, etil-fenoxaprop, p-etil-fenoxaprop);

— fungicide pe bază de benzimidazol sau imidazol (de exemplu carbendazim, fuberidazol, triazoxid);

— amide ale acizilor carboxilici (de exemplu 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida);

— hidrocarburi clorurate (de exemplu endosulfan, DDT, hexaclorobenzen, quintozen, 1,2,3-triclorobenzen);

— insecticide organofosforoase (de exemplu metil-azinfor, disulfoton, fenamifos, izofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);

— fenoli (de exemplu fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol);

— derivați de feniluree (de exemplu izoproturon, monolinuron, pencycuron);

— pigmenți coloranți (de exemplu Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

— hidrocarburi poliaromate (de exemplu acenaften, naftalen);

— ierbicide pe bază de 1,3,5-triazine (de exemplu prometrin, propazină, simazină, terbutrin);

— derivați de triazol (de exemplu tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Prezenta metodă nu se poate aplica la substanțele care reacționează fie cu eluentul, fie cu faza staționară. De asemenea, nu se aplică la substanțele care interacționează în mod specific cu componentele anorganice (de exemplu formarea de complecși ramificați cu mineralele din argilă). Este posibil ca metoda să nu funcționeze la substanțele tensioactive, compușii anorganici și acizii și bazele organici(e) moderați(e) sau puternici(e). Se pot determina valorile log K_{co} cuprinse între 1,5 și 5,0. Determinarea substanțelor ionizabile trebuie să se realizeze cu o fază mobilă tamponată, dar trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea componentelor tamponului sau a substanței testate.

▼B

1.6. CRITERII DE CALITATE

1.6.1. **Acuratețea**

De obicei, coeficientul de adsorbție al unei substanțe testate se poate estima cu o aproximație de ± 0,5 dintr-o unitate logaritmică din valoarea determinată prin metoda de stabilire a echilibrului probelor (tabelul 1 din apendice). Dacă substanțele de referință utilizate au structuri asemănătoare cu cea a substanței testate, se poate obține o acuratețe mai mare.

1.6.2. **Repetabilitatea**

Determinările trebuie să se facă cel puțin în dublu exemplar. Valorile log K_{co} obținute din măsurătorile individuale trebuie să se situeze într-un interval de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

1.6.3. **Reproductibilitatea**

Experiența acumulată până în prezent în aplicarea metodei susține valabilitatea acesteia. Un studiu prin metoda HPLC, în care s-au utilizat 48 substanțe (majoritatea pesticide) pentru care existau date credibile privind K_{co} pentru soluri, a dat un coeficient de corelare R = 0,95 (10) (11).

S-a realizat un studiu comparativ între laboratoare, cu participarea a 11 laboratoare, pentru îmbunătățirea și validarea metodei (12). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 din apendice.

1.7. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.7.1. **Estimarea preliminară a coeficientului de adsorbție**

Coeficientul de partiție octanol-apă P_{ow} (= K_{ow}) și, într-o anumită măsură, solubilitatea în apă se pot utiliza ca indicatori pentru gradul de adsorbție, în special pentru substanțele neionizate și, prin urmare, se pot utiliza pentru aflarea preliminară a domeniului. Au fost publicate o serie de corelații utile pentru câteva grupe de substanțe chimice (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Aparatura**

Este necesar un cromatograf lichid prevăzut cu o pompă fără impulsuri și cu un dispozitiv potrivit de detecție. Se recomandă utilizarea unui injector cu buclă de injecție. Se utilizează rășini pe bază de cianopropil fixat chimic pe suport de silice (de exemplu Hypersil și Zorax CN). O coloană de protecție din același material se poate instala între sistemul de injecție și coloana analitică. Coloanele provenite de la diverși furnizori pot să aibă randamente de separare foarte diferite. Pentru orientare, este necesar să se obțină următorii factori de capacitate k': log k' > 0,0 pentru log K_{co} = 3,0 și log k' > - 0,4 pentru log K_{co} = 2,0 atunci când se utilizează amestec metanol/apă 55/45 % ca fază mobilă.

1.7.3. **Fazele mobile**

Au fost testate câteva faze mobile și se recomandă următoarele două:

— metanol/apă (55/45 % v/v);

— metanol/tampon citrat 0,01 M, pH 6,0 (55/45 % v/v)

▼B

Se utilizează metanolul de tip HPLC și apă distilată sau tampon citrat pentru prepararea solventului de eluție. Amestecul se dezaerează înainte de utilizare. Se utilizează eluția izocratică. Dacă amestecurile metanol/apă nu sunt corespunzătoare, se pot încerca alte amestecuri solvent organic/apă, de exemplu amestecurile etanol/apă sau acrilonitril/apă. Pentru compușii ionizabili se recomandă utilizarea soluției tampon pentru stabilizarea pH-ului. Trebuie să se aibă grijă pentru a evita precipitarea sărurilor și deteriorarea coloanei, care pot să apară la unele amestecuri fază organică/tampon.

Nu se pot utiliza aditivi cum ar fi reactivi cu perechi de ioni, deoarece pot să afecteze proprietățile de sorbție ale fazei staționare. Astfel de modificări ale fazei staționare pot să fie ireversibile. Din acest motiv, este obligatoriu ca testele cu aditivi să se efectueze pe coloane separate.

1.7.4. **Substanța dizolvată**

Substanțele testate și de referință se dizolvă în faza mobilă.

1.8. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.8.1. **Condiții de testare**

Este necesară înregistrarea temperaturii în timpul măsurătorilor. Pentru asigurarea condițiilor constante în timpul etalonării și estimării și măsurării substanței testate, se recomandă cu stringență utilizarea unui compartiment termoreglabil pentru coloană.

1.8.2. **Determinarea timpului mort t_0**

Pentru determinarea timpului mort t_0, se pot utiliza două metode diferite (a se vedea și punctul 1.2).

1.8.2.1. *Determinarea timpului mort t_0 cu ajutorul seriilor omoloage*

S-a dovedit că procedeul de acest tip dă valori t_0 credibile și standardizate. Pentru detalii, a se vedea metoda de testare A.8 Coeficientul de partiție (n-octanol/apă), metoda HPLC.

1.8.2.2. *Determinarea timpului mort t_0 cu substanțe inerte care nu sunt reținute pe coloană*

Procedeul menționat se bazează pe injecția soluțiilor de formamidă, uree sau nitrat de sodiu. Măsurătorile se realizează cel puțin de două ori.

1.8.3. **Determinarea timpilor de retenție t_R**

Se procedează la selectarea substanțelor de referință conform punctului 1.3. Acestea se pot injecta ca amestec etalon pentru determinarea timpilor lor de retenție, cu condiția confirmării că timpul de retenție pentru fiecare etalon nu este afectat de prezența altor etaloane de referință. Etalonarea se face la intervale regulate, cel puțin de două ori pe zi, datorită modificărilor neașteptate în funcționarea coloanei. Pentru cea mai bună practică, injecțiile de etalonare se realizează înainte și după injecțiile de substanță testată pentru a confirma că timpii de retenție nu au fost deplasați. Substanțele testate se injectează separat în cantități cât se poate de mici (pentru a evita supraîncărcarea coloanei) și se determină timpii de retenție pentru acestea.

▼B

Pentru a creşte încrederea în măsurători, trebuie să se realizeze cel puțin două determinări. Valorile log K_{co} obținute din măsurători individuale trebuie să se încadreze într-o valoare de 0,25 dintr-o unitate logaritmică.

1.8.4. **Evaluarea**

Se calculează factorii de capacitate k' din timpul mort t_0 și timpii de retenție t_R pentru substanțele de referință selectate conform ecuației 4 (punctul 1.2). Apoi, se reprezintă grafic valorile log k' ale substanțelor de referință în funcție de valorile log K_{co} ale acestora, obținute din testele cu realizarea echilibrului probelor, prezentate în tabelele 1 și 3 din apendice. Din reprezentarea grafică menționată, valoarea log k' a unei substanțe testate se utilizează apoi pentru determinarea valorii log K_{co} a acesteia. Dacă rezultatele reale indică o valoare a log K_{co} pentru substanța testată în afara domeniului de etalonat, testarea se repetă, utilizând alte substanțe de referință mai potrivite.

2. **DATE ȘI RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

— identitatea testului și a substanțelor de referință și puritatea acestora și valorile pKa, dacă sunt importante;

— descrierea aparaturii și a condițiilor de operare, de exemplu tipul și dimensiunea coloanei analitice (și a celei de protecție), mijloacele de detecție, faza mobilă (raportul componentelor și valoarea pH), valorile temperaturii în timpul măsurătorilor;

— timpul mort și metoda utilizată pentru determinarea acestuia;

— cantitățile de substanțe testate și de referință introduse în coloană;

— timpii de retenție pentru compușii de referință utilizați la etalonare;

— detalii privind linia de regresie ajustată (log k' în funcție de log K_{co}) și un grafic al liniei de regresie;

— datele medii de retenție și valoarea estimată a log K_{co} pentru compusul testat;

— cromatogramele.

3. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of *c*hemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2. J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, p. 1-67.

3. G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

4. C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, p. 227-231.

5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 297-312.

▼B

6. C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, p. 831-832.

7. S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 833-846.

8. W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.

9. M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

10. W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), p. 2341-2352.

11. B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, p. 285-304.

12. W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Apendice

Tabelul 1

Compararea valorilor K_{co} pentru soluri și nămoluri de epurare și valorile calculate cu ajutorul metodei selective HPLC ([1]) ([2])

Substanța	Nr. CAS	Log K_{co} nămoluri de epurare	Log K_{co} HPLC	Δ	Log K_{co} soluri	Log K_{co} HPLC	Δ
Atrazină	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Esterul fenilic al acidului benzoic	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamidă	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamidă	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilidă	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilină	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilină	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), p. 107-119.

Tabelul 2

Rezultatele studiului comparativ între laboratoare (11 laboratoare participante) efectuat pentru îmbunătățirea și validarea metodei HPLC ([1])

Substanța	Nr. CAS	Log K_{co}	K_{co}	log K_{co}
		(OCDE 106)	metoda HPLC	
Atrazină	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Tabelul 3

Substanțele de referință recomandate pentru metoda selectivă HPLC pe baza datelor de adsorbție pe sol

Substanța de referință	Nr. CAS	Valorile medii ale log K_{co} din echilibrul probelor	Nr. de date K_{co}	Log D. S.	Sursa
Acetanilidă	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamidă	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzamidă	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilmenzamidă	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metilbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazină	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Izoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamidă	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilină	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamidă	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,07	5	2,29	(c)
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Triclorobenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Metil-diclofop	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (amestec)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, p. 285-304.
(c) Date din industrie.

▼M7

C.20. **TESTUL DE REPRODUCERE PENTRU *DAPHNIA MAGNA***

INTRODUCERE

Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 211 (2012). Orientările OCDE privind testarea sunt revizuite periodic pentru a lua în considerare progresul științific. Orientarea 211 privind testarea reproducerii provine din Orientarea nr. 202, partea II, test de reproducere la specia *Daphnia* (1984). În general, s-a recunoscut faptul că datele din testele efectuate în conformitate cu orientarea TG 202 ar putea fi variabile. Aceasta a condus la eforturi considerabile pentru identificarea motivelor variabilității cu scopul de a produce o metodă de testare mai bună. Orientarea 211 privind testarea se bazează pe rezultatele acestor activități de cercetare, teste interlaboratoare și studii de validare efectuate în 1992 (1), 1994 (2) și 2008 (3).

Principalele diferențe între versiunea inițială (TG 202, 1984) și a doua versiune (TG 211, 1998) ale orientării privind testarea reproducerii sunt:

— specia recomandată pentru utilizare este *Daphnia magna*;

— durata testului este de 21 de zile;

— pentru testele semistatice, numărul de animale care urmează să fie utilizate la fiecare concentrație de testat a fost redus de la cel puțin 40, de preferință împărțite în patru grupe de câte 10 animale, la cel puțin 10 animale ținute în mod individual (cu toate că se pot utiliza diferite modele pentru testele în regim dinamic);

— au fost efectuate recomandări mai specifice cu privire la mediul de testare și condițiile de alimentație.

— principalele diferențe dintre a doua versiune a orientării privind testarea reproducerii (TG 211, 1998) și prezenta versiune sunt:

— a fost adăugat apendicele 7 pentru a descrie procedurile de identificare a sexului nou-născuților, dacă este necesar. În conformitate cu versiunile anterioare ale acestei metode de testare, raportul dintre sexe este un parametru opțional;

— numărul variabilelor de răspuns al descendenților în viață produși de fiecare animal părinte supraviețuitor a fost completat cu o variabilă de răspuns suplimentară pentru reproducerea dafniei, și anume numărul total de descendenți în viață produși la sfârșitul testului de fiecare părinte dafnia, la începutul testului eliminându-se din analiză mortalitatea parentală accidentală și/sau inadvertentă. Scopul variabilei de răspuns adăugate este de a alinia această variabilă de răspuns cu alte metode de testare de reproducere pe nevertebrate. În plus, în ceea ce privește această variabilă de răspuns, este posibil ca, în prezenta metodă de testare, să se elimine o sursă de erori, și anume efectul de mortalitate parentală accidentală și/sau inadvertentă, în cazul în care aceasta apare în timpul perioadei de expunere.

— orientări statistice suplimentare pentru modelul de testare și pentru interpretarea rezultatelor au fost incluse atât pentru CEx (de exemplu CE10 sau CE50), cât și pentru abordarea CFEO/CMEO.

— se introduce un test limită.

Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

Obiectivul principal al testului este evaluarea efectului substanțelor chimice asupra randamentului de reproducere al *Daphnia magna.*În acest scop, femelele tinere de dafnia (animale părinți), în vârstă de mai puțin de 24 de ore la începutul testului, sunt expuse la substanța de testat adăugată într-o o serie de concentrații diferite. Durata testului este de 21 de zile. La sfârșitul testului, se evaluează numărul total de descendenți în viață produși. Capacitatea de reproducere a exemplarelor părinți se poate exprima în alte moduri (de exemplu, numărul de descendenți în viață produși per animal per zi, din prima zi în care s-au observat descendenții), dar acestea se raportează în plus față de numărul total de descendenți în viață produși la sfârșitul testului. Având în vedere conceperea

▼M7

deosebită a testului în regim semistatic în comparație cu alte metode de testare a reproducerii la nevertebrate, este posibil, de asemenea, să contabilizeze numărul de descendenți în viață produși de fiecare animal părinte. Aceasta permite ca, spre deosebire de alte metode de testare a reproducerii la nevertebrate, în cazul în care animalul părinte moare în mod accidental și/sau în mod inadvertent în timpul perioadei de testare, producția de descendenți a acestuia să poată fi exclusă din evaluarea datelor. Prin urmare, în cazul în care mortalitatea parentală apare la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu în cazul în care există un regres important al răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (în acest sens se poate utiliza un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, atunci se exclud din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie unui efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclud din analiză. Dacă animalul părinte moare în timpul testului și anume, accidental din utilizarea necorespunzătoare ori ca urmare a unui accident, sau inadvertent din cauza unui incident inexplicabil care nu are legătură cu efectul substanței chimice de testat, sau se dovedește a fi mascul, atunci replica se exclude din analiză (pentru detalii, a se vedea punctul 51). Efectul toxic al substanței chimice de testat asupra capacității de reproducere este exprimat ca CEx prin introducerea datelor într-un model adecvat prin regresie neliniară pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu x % a capacității de reproducere, respectiv sau în mod alternativ, ca valoarea CFEO/CMEO (4). *Concentrațiile de testat, de preferință, trebuie să încadreze cea mai mică dintre concentrații de efect utilizate (de exemplu, CE_{10}), ceea ce înseamnă că această valoare se calculează prin interpolare și nu extrapolare.*

Se raportează, de asemenea, supraviețuirea animalelor părinți și timpul până la producerea primilor pui. Se pot examina, de asemenea, alte efecte ale substanței chimice asupra unor parametri precum creșterea (de exemplu, lungimea) și posibil rata intrinsecă de înmulțire a populației (a se vedea punctul 44).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTAT

Rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea capitolul C.2 din prezenta anexă: *Daphnia* sp. testul imobilizării acute) efectuat cu *Daphnia magna* pot fi utile la selectarea unui interval adecvat de concentrații în testele de reproducere. Este necesar să se cunoască solubilitatea în apă și presiunea de vapori a substanței chimice de testat și să existe o metodă analitică fiabilă pentru determinarea cantitativă a substanței chimice în soluțiile experimentale, cu eficiența recuperării și limita de detecție specificate.

Datele privind substanța chimică de testat care pot fi utile în stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, puritatea substanței chimice, stabilitatea la lumină, stabilitatea în condițiile testului, pKa, P_{ow} și rezultatele testului pentru biodegradabilitatea rapidă [a se vedea capitolele C.4 (determinarea biodegradabilității „rapide”) și C.29 (biodegradabilitatea rapidă – CO_2 în vase închise ermetic) din prezenta anexă].

VALIDITATEA TESTULUI

Pentru ca un test să fie valid, martorul (martorii) trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

— mortalitatea animalelor părinți (femele de dafnia) să nu depășească 20 % la sfârșitul testului;

— numărul mediu de descendenți vii produși per animal părinte supraviețuitor la sfârșitul testului să fie ≥ 60.

Notă: Același criteriu de validitate (20 %) poate fi utilizat pentru mortalitatea parentală accidentală și inadvertentă pentru martori, precum și pentru fiecare concentrație de testat.

▼M7

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

Vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu soluțiile de testat trebuie să fie realizate în întregime din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. De regulă, vasele de testare sunt pahare Berzelius din sticlă.

În plus, vor fi necesare unele sau toate aparatele următoare:

— contor de oxigen (cu microelectrod sau alt dispozitiv corespunzător pentru măsurarea oxigenului dizolvat în probe de volum mic);

— aparatură adecvată pentru controlul temperaturii;

— pH-metru;

— aparat pentru determinarea durității apei;

— aparat pentru determinarea concentrației totale de carbon organic (COT) în apă sau aparat pentru determinarea consumului chimic de oxigen (CCO);

— aparat specific pentru controlul regimului de iluminare și măsurarea intensității luminii.

Organismul de testat

Specia care urmează să fie utilizată în test este *Daphnia magna* Straus ([1]).

De preferință, clonul trebuie să fi fost identificat după genotip. Studiul (1) a arătat că performanța de reproducere a clonului A (care provine din IRCHA din Franța) (5) satisface complet criteriile de validitate pentru o medie de ≥ 60 descendenți vii per animal părinte supraviețuitor atunci când se cultivă în condițiile descrise în prezenta metodă. Cu toate acestea, se acceptă și alți cloni, cu condiția să se indice îndeplinirea de către cultura de dafnia a criteriilor de validitate pentru test.

La începutul testului, animalele trebuie să fie mai tinere de 24 de ore și nu trebuie să fie prima generație. Acestea trebuie să provină dintr-o colonie sănătoasă (și anume, fără semne de stres, cum ar fi mortalitatea mare, prezența masculilor și ephippia, întârziere în producerea primilor descendenți, animale decolorate etc.). Animalele din colonie se mențin în condiții de cultură (lumină, temperatură, mediu, hrană și număr de animale per unitate de volum) similare cu cele utilizate în test. În cazul în care mediul de cultură care urmează să fie utilizat în test este diferit de cel pentru cultura obișnuită de dafnia, este o bună practică să se includă o perioadă de aclimatizare înaintea testului, de regulă de aproximativ trei săptămâni (și anume, o generație) pentru a evita stresarea animalelor părinți.

Mediul de testare

În cadrul acestui test, se recomandă utilizarea unui mediu bine definit. Acesta poate să evite utilizarea aditivilor (de exemplu, plante de mare, extract de sol) a căror caracterizare este dificilă și, prin urmare, se îmbunătățesc posibilitățile de standardizare între laboratoare. S-a dovedit că mediile Elendt M4 (6) și M7 (a se vedea apendicele 2) sunt potrivite în acest sens. Cu toate acestea, alte medii [de exemplu, (7) (8)] sunt acceptabile cu condiția ca acestea să asigure realizarea unei culturi de dafnia care să întrunească criteriile de validitate pentru test.

([1]) Se pot utiliza alte dafnii, cu condiția ca acestea să îndeplinească criteriile de validitate, după caz (criteriul de validitate referitor la capacitatea de reproducere la martori este relevant pentru *toate* speciile). În cazul în care se utilizează alte dafnii, acestea trebuie să fie identificate în mod clar și să se justifice utilizarea lor.

▼M7

În cazul în care se utilizează medii conținând aditivi care nu sunt caracterizați, este necesar ca aditivii respectivi să se specifice clar și, în raportul de testare, să se prezinte date privind compoziția, în special conținutul de carbon, deoarece acesta poate contribui la hrana furnizată. Se recomandă determinarea concentrației de carbon organic total (COT) și a consumului chimic de oxigen (CCO) la prepararea amestecului de aditivi organici și să se efectueze o estimare a contribuției rezultate la COT/CCO în mediul de testare. De asemenea, se recomandă ca valorile COT în mediu (și anume, înainte de adăugarea algelor) să fie mai mici de 2 mg/l (9).

Atunci când se testează substanțe chimice cu conținut de metale, este important să se admită că proprietățile mediului de testare (de exemplu, duritatea, capacitatea de chelatizare) ar putea avea legătură cu toxicitatea substanței studiate. Din acest motiv, este de preferat un mediu bine caracterizat. Cu toate acestea, în prezent, singurele medii bine caracterizate care se cunosc ca fiind optime pentru cultura pe termen lung a *Daphnia magna* sunt Elendt M4 și M7. Ambele medii conțin agentul de chelatizare EDTA. Cercetările (2) arată că „toxicitatea aparentă” a cadmiului este în general mai mică atunci când testul de reproducere se realizează în mediile M4 și M7 decât în mediile cu conținut de EDTA. Prin urmare, M4 și M7 nu se recomandă pentru testarea substanțelor chimice ce conțin metale și se evită, de asemenea, utilizarea altor medii ce conțin agenți de chelatizare cunoscuți. Pentru substanțele cu conținut de metale, se poate recomanda utilizarea unui mediu alternativ precum, de exemplu, apa dură proaspătă reconstituită conform ASTM (9) care nu conține EDTA. Combinația de apă dură proaspătă reconstituită conform ASTM și extract de plante de mare este potrivită pentru cultura pe termen lung a *Dahnia magna* (2).

Concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie mai mare de 3 mg/l la începutul și în timpul testului. PH-ul trebuie să aibă valori în intervalul 6-9 și, în mod normal, nu trebuie să varieze cu mai mult de 1,5 unități în oricare din teste. Se recomandă o duritate mai mare de 140 mg/l (exprimată în $CaCO_3$). Testele efectuate la această valoare și la valori mai mari au demonstrat o performanță a reproducerii conformă cu criteriile de validitate (11) (12).

Soluții de testat

Se prepară, de regulă, soluții de testat în concentrațiile alese prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile mamă se prepară de preferință, fără utilizarea oricăror solvenți sau agenți de dispersie, dacă este posibil, prin amestecarea sau agitarea substanței chimice de testat în mediul de testat utilizând mijloace mecanice precum agitarea, amestecarea sau ultrasonarea sau alte metode adecvate. Este de preferat să se expună sistemele de testat la concentrații ale substanței chimice de testat care urmează să fie utilizate în studiu atât timp cât este necesar pentru a demonstra menținerea concentrațiilor de expunere stabile înainte de introducerea organismelor de testat. În cazul în care substanța chimică de testat se dizolvă greu în apă, se urmează procedurile descrise în Orientările OCDE pentru manipularea substanțelor dificile (13). Se evită utilizarea solvenților sau a agenților de dispersie, dar aceasta poate fi necesară în anumite cazuri pentru a produce o soluție stoc cu o concentrație corespunzătoare de dozare.

O apă de diluție martor cu replici adecvate și, dacă nu se poate evita, un solvent martor cu replici adecvate se efectuează în plus față de concentrațiile de testare. Numai solvenții sau agenții de dispersie care au fost investigați a nu avea efecte semnificative sau a avea doar efecte minime asupra variabilei de răspuns se utilizează în test. La referința (13) se furnizează exemple de solvenți adecvați (de exemplu, acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilen glicolul) și agenți de dispersie (de exemplu Cremophor RH40, metilceluloza 0,01 % și HCO- 40). În cazul în care se utilizează un solvent sau agent de dispersie, concentrația finală a acestuia nu trebuie să depășească 0,1 ml/l (13) și trebuie

▼M7

să fie aceeași concentrație în toate vasele de testare, cu excepția martorului de apă de diluție. Cu toate acestea, se depun toate eforturile pentru a menține la minimum concentrației solventului.

PROCEDURĂ

Condiții de expunere

Durată

Durata testului este de 21 de zile.

Încărcarea

Animalele părinți se țin individual, câte unul pentru fiecare vas de testare, de regulă cu 50100 ml (pentru *Daphnia magna*, pot fi posibile volume mai mici, în special pentru dafniile mai mici, de exemplu, *Ceriodaphnia dubia*) de mediu în fiecare vas de testare, cu excepția cazului în care un model de testare în flux continuu este necesar pentru testare.

Uneori, ar putea să fie necesare volume mai mari pentru a satisface condițiile procedeului analitic utilizat pentru determinarea concentrației substanței chimice de testat, cu toate că reunirea replicilor pentru analiza chimică este permisă, de asemenea. În cazul în care se utilizează volume mai mari de 100 ml, rația furnizată pentru dafnia ar putea necesita creștere pentru a asigura disponibilitatea alimentației adecvate și respectarea criteriilor de validitate.

Animalele de experiență

Pentru testele semistatice, sunt necesare cel puțin 10 animale ținute fiecare la fiecare concentrație de testat și cel puțin 10 animale ținute fiecare în seria martor.

Pentru testele în flux continuu, s-a dovedit că sunt necesare 40 de animale împărțite în patru grupe de câte 10 animale pentru fiecare concentrație de testat (1). Se pot utiliza mai puține organisme de testat și se recomandă un minimum de 20 de animale per concentrație, împărțite în două sau mai multe replici cu un număr egal de animale (de exemplu patru replici, fiecare cu câte cinci dafnii). De reținut faptul că, pentru testele în care animalele sunt ținute în grupe, nu va fi posibil să se excludă descendenții de la analiza statistică în cazul în care se produce mortalitatea parentală inadvertentă/accidentală atunci când reproducerea a început și, prin urmare, în aceste cazuri, capacitatea de reproducere se exprimă în numărul total de descendenți vii produși per părinte prezent la începutul testului.

Tratamentele se repartizează tuturor vaselor de testat și toată manipularea ulterioară a vaselor de testat se face în mod aleatoriu. Nerespectarea acestui principiu poate să aducă prejudicii care pot fi interpretate ca fiind un efect al concentrației. În special, dacă unitățile experimentale sunt manipulate în ordinea tratamentului sau a concentrației, atunci unele efecte care depind de timp, cum ar fi oboseala operatorului sau altă eroare, ar putea să genereze efecte mai mari la concentrații mai mari. În plus, dacă există posibilitatea ca rezultatele testului să fie influențate de o condiție inițială sau de mediu a testului, precum poziția în laborator, atunci se ia în vedere blocarea testului.

Hrănirea

Pentru testele semistatice, hrana se administrează de preferință zilnic, dar cel puțin de trei ori pe săptămână (și anume, corespunzător modificărilor mediilor). Se ia în considerare posibila diluare a concentrațiilor de expunere prin adăugarea de produse alimentare și se evită cât mai mult posibil în cazul suspensiilor de alge bine concentrate. Se consemnează orice abatere de la această regulă (de exemplu, pentru testele în flux continuu).

Pe durata testului, hrana animalelor părinți este alcătuită, de preferință, din celule de alge vii din una sau mai multe dintre următoarele specii: sp. *Chlorella*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (înainte *Selenastrumcapricornutum*) și *Desmodesmus subspicatus* (înainte *Scenedesmussubspicatus*). Regimul alimentar se bazează pe cantitatea de carbon organic (C) administrat pentru fiecare animal părinte. Cercetările (14) au arătat că, pentru *Daphnia magna*, rațiile cuprinse între 0,1 și 0,2 mg C/dafnia/zi sunt suficiente pentru obținerea numărului necesar de descendenți care să satisfacă criteriile de validitate a testului. Rația se poate

▼M7

administra fie sub forma unei rate constante pe toată perioada testului sau, dacă se dorește, se administrează o porție mai mică la început și apoi se crește în timpul testului, ținând cont de creșterea animalelor părinți. În acest caz, rația trebuie să rămână totuși în valorile recomandate de 0,1-0,2 mg C/dafnia/zi tot timpul.

În cazul în care urmează să se utilizeze măsuri înlocuitoare, de exemplu, numărul de celule de alge sau absorbanța luminii, la administrarea rației (și anume, pentru ușurință, deoarece măsurarea conținutului de carbon durează mult), fiecare laborator trebuie să-și realizeze propria nomogramă referitoare la măsura înlocuitoare pentru conținutul de carbon al culturii de alge (a se vedea apendicele 3 pentru recomandarea privind realizarea nomogramei). Nomogramele se verifică cel puțin anual și mai frecvent dacă au fost schimbate condițiile de cultură ale algelor. S-a constatat că absorbanța luminii este un înlocuitor mai bun pentru conținutul de carbon decât numărul de celule (15).

Pentru a minimiza volumul mediului de cultură de alge transferat în vasele de testare se administrează o suspensie de alge concentrată pentru dafnia. Concentrația de alge se poate obține prin centrifugare urmată de resuspensie în mediu de cultură pentru dafnia.

Lumină

16 ore de lumină la o intensitate de maximum 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ măsurată la suprafața apei vasului. În cazul instrumentelor de măsurare a luminii calibrate în lucși, un interval echivalent de 1000-1500 lucși pentru lumină albă rece corespunde aproximativ intensității luminoase recomandate 15-20 μE · m-2 · s-1.

Temperatura

Temperatura mediilor de testare trebuie să fie cuprinsă între valorile 18- 22 °C. Cu toate acestea, pentru niciun test temperatura nu trebuie să varieze, dacă se poate, cu mai mult de 2 °C în limitele specificate (de exemplu 18-20, 19-21 sau 20-22 °C). Utilizarea unui vas de testare suplimentar ar putea să fie necesară pentru urmărirea temperaturii.

Aerarea

Vasele de testare nu se aerează în timpul testului.

Modelul testului

Testul de stabilire a intervalului

Atunci când este necesar, se desfășoară un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații de substanță chimică de testat și două replici pentru fiecare tratament și martor. Informații suplimentare, obținute din testele cu substanțe chimice similare sau din literatura de specialitate, privind toxicitatea acută pentru dafnie și/sau alte organisme acvatice pot fi utile, de asemenea, pentru a lua decizii cu privire la intervalul de concentrații care urmează să fie utilizate în testul de stabilire a intervalului.

Durata testului de stabilire a intervalului este de 21 de zile sau o perioadă suficientă de a estima în mod fiabil nivelurile de efecte. La sfârșitul testului, se evaluează reproducerea dafniei. Se înregistrează numărul părinților și apariția descendenților.

Testul definitiv

În mod normal, trebuie să existe cel puțin cinci concentrații de testat care să delimiteze concentrația efectivă (de exemplu, CE_x) și aranjate într-o serie geometrică cu un factor de separare, de preferință, de maximum 3,2. Se utilizează un număr adecvat de replici pentru fiecare concentrație de testat (a se vedea punctele 24-25). Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Substanțele chimice nu se testează la concentrații mai mari decât limita de solubilitate a acestora în mediul de testare. Înainte de a desfășura experimentul,

▼M7

este necesar să se ia în considerare puterea statistică a modelelor de testare și utilizarea de metode statistice adecvate (4). La stabilirea intervalului de concentrații, se rețin următoarele:

(i) Atunci când se estimează CE_x pentru efectele asupra reproducerii, se recomandă utilizarea unor concentrații suficiente pentru stabilirea CE_x cu un nivel corespunzător de încredere. Concentrațiile de testat utilizate trebui să delimiteze, de preferință, CE_x estimat astfel încât CE_x să fie determinat prin interpolare, mai degrabă decât prin extrapolare. Mai multe concentrații de testare (de exemplu, 10) și mai puține replici pentru fiecare concentrație (de exemplu, 5, astfel menținând constant numărul total de vase) și cu 10 martori este un avantaj pentru următoarele analize statistice.

(ii) Pentru estimarea CMEO și/sau CFEO, concentrația cea mai mică de testare trebuie să fie suficient de mică, astfel încât capacitatea de reproducere la concentrația respectivă să nu fie cu mult mai mică decât cea din martor. În cazul în care nu se întâmplă acest lucru, testul se repetă cu concentrația cea mai mică redusă.

(iii) Pentru estimarea CMEO și/sau CFEO, cea mai mare concentrație de testare trebuie să fie suficient de mare încât capacitatea de reproducere la concentrația respectivă să fie cu mult mai mică decât cea din martor. În cazul în care nu se întâmplă acest lucru, testul se repetă cu concentrația cea mai mare sporită, cu excepția cazului în care concentrația maximă de testare necesară pentru testarea efectelor cronice (și anume, 10 mg/l) a fost utilizată ca cea mai mare concentrație de testat în testul inițial.

În cazul în care nu se observă efecte la cea mai mare concentrație în testul de stabilire a intervalului (de exemplu, la 10 mg/l) sau atunci când substanța chimică de testat are foarte probabil un nivel redus/fără toxicitate pe baza lipsei de toxicitate de la alte organisme și/sau un nivel scăzut/fără absorbție, testul de reproducere poate fi efectuat ca un test limită, utilizând o concentrație de testare, de exemplu, de 10 mg/l și martorul. Se utilizează zece replici atât pentru grupul de tratament, cât și pentru grupul martor. Atunci când un test limită ar putea necesita să fie efectuat într-un sistem în flux continuu, ar fi adecvat un număr mai mic de replici. Un test limită va oferi posibilitatea de a demonstra că nu există niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic la concentrația limită, dar în cazul în care se înregistrează efecte, se solicită, în mod normal, o testare completă.

Controale

În plus față de seria pentru test, se realizează o serie de probe martor pentru mediul de testare și, de asemenea, dacă este relevant, o serie de probe martor care conțin solventul sau agentul de dispersie. Atunci când se utilizează, concentrația solventului sau agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele ce conțin substanța chimică de testat. Se utilizează un număr corespunzător de replici (a se vedea punctele 23-24).

În general, într-un test bine realizat, coeficientul de variație în jurul numărului mediu de descendenți vii obținuți per animal părinte în martor (martori) este $\leq$ 25 % și acest lucru se consemnează în modelele testului care utilizează animale ținute separat.

Reînnoirea mediului de testare

Frecvența reînnoirii mediului de testare depinde de stabilitatea substanței de testat, dar trebuie să fie de cel puțin trei ori pe săptămână. În cazul în care, din testele preliminare de stabilitate (a se vedea punctul 7), concentrația substanței chimice de testat nu este stabilă (și anume, nu se încadrează în intervalul 80-120 %) din valoarea nominală sau este mai mică de 80 % din concentrația inițială măsurată) în perioada maximă de reînnoire (și anume, trei zile), se ia în considerare o reînnoire mai frecventă a mediului sau utilizarea unui test în flux continuu.

▼M7

Atunci când un mediu este reînnoit în teste semistatice, se pregătește o a doua serie de vase de testat și animalele părinți se transferă în acestea cu ajutorul, de exemplu, al unei pipete de sticlă cu un diametru potrivit. Volumul mediului transferat cu *Dafnia* trebuie să fie minim.

Observații

Rezultatele observațiilor efectuate în timpul testului se consemnează în fișe tehnice (a se vedea exemple în apendicele 4 și 5). În cazul în care sunt necesare alte măsurători (a se vedea punctul 44), ar putea să fie necesare observații suplimentare.

Descendenți

Descendenții produși de fiecare animal părinte se îndepărtează, de preferință, și se numără zilnic de la apariția primilor pui, pentru a preveni ca aceștia să consume hrana destinată părinților. În sensul acestei metode, se numără numai numărul de descendenți vii, dar se consemnează și prezența ouălor avortate sau a descendenților decedați.

Mortalitate

Mortalitatea în rândul animalelor părinți se înregistrează, de preferință, zilnic sau cel puțin la fel de frecvent ca numărarea descendenților.

Alți parametri

Cu toate că această metodă de testare este destinată în principal evaluării efectelor asupra capacității de reproducere, este posibil să se poată măsura, de asemenea, alte efecte suficiente pentru a permite o analiză statistică. Capacitatea de reproducere per animal părinte supraviețuitor, și anume numărul de descendenți în viață produși per părinte supraviețuitor în timpul testării, poate fi înregistrată. Aceasta poate fi comparată cu principala variabilă de răspuns (capacitatea de reproducere per animal părinte în momentul începerii testului care nu a decedat din cauze inadvertente sau accidentale în timpul testului). În cazul în care se produce mortalitate parentală la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu, în cazul în care există o regresie semnificativă a răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage poate fi utilizat în acest sens). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, atunci se exclud din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie ca un efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclud din analiza rezultatelor testului. Măsurătorile de creștere sunt deosebit de recomandate, având în vedere faptul că acestea furnizează date privind posibilele efecte subletale, care ar putea să fie mai utile decât determinarea numai a reproducerii; se recomandă măsurarea lungimii animalelor părinți (și anume, lungimea corpului, fără spin anal) la sfârșitul testului. Alți parametri care se pot măsura sau calcula includ timpul până la producerea primului pui (și a puilor ulteriori), numărul și dimensiunea puilor per animal, numărul de pui avortați, prezența masculilor nou-născuți (OCDE, 2008) sau ephippia și posibil rata intrinsecă a creșterii populației (a se vedea apendicele 1 pentru definiție și apendicele 7 pentru identificarea sexului nou-născuților).

Frecvența determinărilor analitice și a măsurătorilor

Este necesar să se măsoare concentrația oxigenului, temperatura, duritatea și valorile pH-ului cel puțin o dată pe săptămână, în mediile proaspete și cele vechi, în proba (probele) martor și în concentrațiile cele mai mari de substanță chimică de testat.

În timpul testului, se determină concentrațiile substanței chimice de testat la intervale regulate.

În testele semistatice în cadrul cărora se estimează o menținere a concentrației substanței chimice de testat în limitele de ± 20 la sută din cea nominală (și anume, în intervalul de 80-120 la sută – a se vedea punctele 6, 7 și 39), se recomandă analizarea cel puțin a celei mai mari și a celei mai mici concentrații

▼M7

de testare, atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și când sunt reînnoite în timpul primei săptămâni de testare (și anume, analizele se realizează pe o probă din aceeași soluție – atunci când este proaspăt preparată și la reînnoire). Ulterior, se repetă aceste determinări la intervale de cel puțin o săptămână.

În cazul testelor în care nu se estimează menținerea concentrației substanței chimice de testat în limitele de ± 20 la sută din cea nominală, este necesară analizarea tuturor concentrațiilor de testare atunci când soluțiile sunt proaspăt preparate și la reînnoire. Cu toate acestea, în cazul testelor în care concentrația inițială măsurată a substanței chimice de testat nu se situează în limitele de ± 20 la sută din cea nominală, dar se pot aduce dovezi care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (și anume, în intervalul de 80-120 la sută din concentrațiile inițiale), determinările chimice se pot reduce în săptămânile 2 și 3 de testare, la cea mai mare și cea mai mică concentrație de testare. În toate cazurile, este necesar să se determine concentrațiile substanței chimice de testat înaintea reînnoirii doar la un vas replică pentru fiecare concentrație de testare.

În cazul în care se utilizează un test cu flux continuu, se recomandă un regim de prelevare a probelor similar cu cel descris pentru testele semistatice (dar măsurarea soluțiilor „vechi" nu se aplică în acest caz) Cu toate acestea, ar putea fi recomandabil să se crească numărul prelevărilor de probe în prima săptămână (de exemplu, trei seturi de măsurători) pentru a asigura menținerea stabilității concentrațiilor de testare. La aceste tipuri de testări, se verifică zilnic debitul diluantului și al substanței chimice de testat.

În cazul în care se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului a concentrației substanței chimice testate în limitele de ± 20 la sută din cea nominală sau măsurată inițial, atunci rezultatele se pot obține din valoarea nominală sau din cea măsurată inițial. În cazul în care abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial este mai mare de ± 20 la sută, este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media ponderată în timp (a se vedea orientările pentru calculul din apendicele 6).

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

Scopul acestui test este determinarea efectului unei substanțe chimice de testat asupra capacității de reproducere. Numărul total de descendenți în viață per animal părinte se calculează pentru fiecare vas de testare (și anume, replică). În plus, reproducerea poate fi calculată pe baza producției de descendenți în viață de către organismul părinte supraviețuitor. Cu toate acestea, cea mai relevantă variabilă de răspuns din punct de vedere ecologic este numărul total de descendenți în viață produși per animal părinte care nu mor în mod accidental ([1]) sau în mod inadvertent ([2]) în timpul testului. În cazul în care animalul părinte moare în timpul testului în mod accidental sau inadvertent sau se dovedește a fi mascul, replica se exclude din analiză. Analiza se va efectua ulterior pentru un număr redus de replici. În cazul în care se produce mortalitate parentală la replicile expuse, se ia în considerare dacă mortalitatea urmează sau nu un tipar concentrație-răspuns, de exemplu, în cazul în care există o regresie semnificativă a răspunsului în funcție de concentrația substanței chimice de testat cu o pantă pozitivă (un test statistic precum testul de stabilire a tendinței Cochran-Armitage poate fi utilizat în acest sens). În cazul în care mortalitatea nu urmează un tipar concentrație-răspuns, se exclud din analiza rezultatelor testului acele replici cu mortalitate parentală. În cazul în care mortalitatea urmează un tipar concentrație-răspuns, mortalitatea parentală se atribuie ca un efect al substanței chimice de testat și replicile nu se exclud din analiza rezultatelor testului.

Rezumând, atunci când CMEO și CFEO sau CE_x sunt utilizate pentru a exprima efectele, se recomandă să se calculeze efectul asupra reproducerii prin utilizarea ambelor variabile de răspuns menționate mai sus, și anume

([1]) Mortalitate accidentală: mortalitate care nu este legată de substanța chimică cauzată de un incident accidental (și anume, cauză cunoscută)

([2]) Mortalitate inadvertentă: mortalitate care nu este legată de substanța chimică fără o cauză cunoscută

▼M7

— ca numărul total de descendenți în viață produși per animal părinte care nu mor în mod accidental sau în mod inadvertent în timpul testului și;

— ca numărul de descendenți în viață produși per animal părintelui supraviețuitor;

și ulterior să se utilizeze ca rezultat final cea mai scăzută CFEO și CMEO sau valoarea E'CE_x calculate prin utilizarea oricărei dintre aceste două variabile de răspuns.

Înainte de utilizarea analizei statistice, de exemplu, proceduri ANOVA, compararea tratamentelor asupra martorilor prin testul-t student, testul Dunnett, testul Williams, testul Jonckheere-Terpstra regresiv, se recomandă luarea în considerare a transformării datelor în cazul în care acest lucru este necesar pentru îndeplinirea cerințelor unui anumit test statistic. În ceea ce privește alternativele neparametrice, se pot lua în considerare testele Dunn sau Mann-Whitney. Intervale de încredere de 95 % sunt calculate pentru mediile tratamentelor individuale.

Numărul părinților supraviețuitori în martorii netratați este un criteriu de validitate și se documentează și se raportează. De asemenea, se raportează în raportul final toate celelalte efecte dăunătoare, de exemplu comportamentul anormal și constatările semnificative din punct de vedere toxicologic.

CEx

Valorile CEx, inclusiv limitele de încredere inferioară și superioară ale acesteia, sunt calculate utilizând metode statistice adecvate (de exemplu, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Karber sau interpolarea simplă). Pentru a calcula CE10, CE_{50} sau orice altă CEx se supune analizei de regresie întregul set de date.

CFEO/CMEO

În cazul în care o analiză statistică are ca scop determinarea CFEO/CMEO se utilizează metode statistice adecvate în conformitate cu documentul 54 al OCDE intitulat „Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application” (Abordări actuale privind analiza statistică a datelor de ecotoxicitate: orientări pentru aplicare) (4). În general, se investighează efectele adverse ale substanței chimice de testat în comparație cu proba martor prin testarea unei ipoteze unilaterale la $p \leq 0,05$.

Distribuția normală și omogenitatea varianței pot fi testate utilizând un test statistic corespunzător, de exemplu, testul Shapiro-Wilk și, respectiv, testul Levene ($p \leq 0,05$). Se poate efectua testul ANOVA unilateral sau teste multicomparative ulterioare. Comparații multiple (de exemplu, testul Dunnett) sau testele de stabilire a tendințelor (de exemplu, testul Williams sau testul Jonckheere-Terpstra regresiv) pot fi utilizate pentru a calcula dacă există diferențe semnificative ($p \leq 0,05$) între martori și diferitele concentrații de substanță chimică de testat [selecția testului recomandat, în conformitate cu documentul de orientare nr. 54 al OCDE (4)]. În caz contrar, se pot utiliza metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru a determina CFEO și CMEO.

Test limită

În cazul în care a fost efectuat un test limită (compararea martorului și un singur tratament) și se îndeplinesc condițiile prealabile ale procedurile de testare parametrice (normalitate, omogenitatea), răspunsurile metrice pot fi evaluate prin intermediul testului Student (test t). Se poate utiliza un test t al varianței inegale (precum testul Welch) sau un test neparametric precum Mann-Whitney-U, în cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite.

Pentru a determina diferențele semnificative dintre martori (martor și solvent sau martor de dispersie), se pot testa replicile fiecărui martor astfel cum este descris pentru testul limită. În cazul în care aceste teste nu detectează diferențe semnificative, se pot reuni toți martori și replicile martor tratate cu solvent. În caz contrar, se compară toate tratamentele cu martorul tratat cu solvent.

▼M7

Raport de testare

Raportul de testare include următoarele:

Substanța chimică de testat:

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante;

— date de identificare chimică, inclusiv puritatea.

Speciile de testare:

— clonul (dacă a fost caracterizat genetic, astfel încât să corespundă speciei), furnizorul sau sursa (dacă se cunoaște) și condițiile de cultură utilizate. În cazul în care se utilizează o specie diferită de *Daphnia magna*, acest lucru se înregistrează și se justifică.

Condiții de testare:

— procedura de testare utilizată (de exemplu, semistatic sau în flux continuu, volumul, încărcarea în număr de dafnia pe litru);

— fotoperioada și intensitatea luminii;

— modelul testului (de exemplu, numărul de replici, numărul de părinți pentru fiecare replică);

— detalii privind mediul de cultură utilizat;

— adaosurile de material organic, în cazul în care se utilizează, inclusiv compoziția, sursa, metoda de preparare, raportul COT/CCO al preparatelor stoc, determinarea raportului COT/CCO rezultat în mediul de testare;

— informații detaliate privind hrana, inclusiv cantitatea (în mg C/dafnia/zi) și calendarul [de exemplu, tipul alimentului (alimentelor), inclusiv, pentru alge, denumirea specifică (specia) și, dacă se cunoaște, familia, condițiile de cultură);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (se menționează solventul sau agentul de dispersie și concentrația acestuia, dacă este cazul).

Rezultate:

— rezultatele oricăror studii preliminare privind stabilitatea substanței chimice de testat;

— concentrațiile de testare nominale și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice de testat în vasele de testare (a se vedea fișele tehnice din apendicele 5); de asemenea, se raportează eficiența de recuperare a metodei și limita determinării;

— calitatea apei din vasele de testare (și anume, pH, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat și COT și/sau CCO și duritatea, dacă este cazul) (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);

— fișa completă a producției de descendenți în viață în timpul testului de către fiecare animal părinte (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);

— numărul de decese printre animalele părinți și ziua în care au avut loc (a se vedea exemplul de fișă tehnică din apendicele 4);

— coeficientul de variație pentru controlul capacității de reproducere (pe baza numărului total de descendenți în viață per animal părinte în viață la sfârșitul testului);

— reprezentarea grafică a numărului total de descendenți în viață produși per animal părinte în fiecare replică, excluzând orice animal părinte care au murit în mod accidental sau inadvertent în timpul testului în funcție de concentrația substanței chimice de testat;

▼M7

— după caz, reprezentarea grafică a numărului total de descendenți în viață produși per animal părinte supraviețuitor la fiecare replică în funcție de concentrația substanței chimice de testat

— după caz, concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO) pentru reproducere, inclusiv o descriere a metodelor statistice utilizate și o identificare a dimensiunii efectului care ar putea să fie detectat (în acest sens se poate efectua o analiză a puterii înainte de începerea experimentului) și concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO) pentru reproducere; informații cu privire la variabila de răspuns utilizată pentru a calcula valoarea CMEO și CFEO (fie pentru numărul total de descendenți în viață per organism matern care nu a decedat în mod accidental sau inadvertent în timpul testului sau ca numărul total de descendenți în viață per organism matern supraviețuitor), după caz, se raportează, de asemenea, CMEO sau CFEO pentru mortalitatea animalelor părinți;

— dacă este cazul, CE_x pentru reproducere cu intervalele de încredere (de exemplu, 90 % sau 95 %) și reprezentarea grafică a modelului ajustat utilizat pentru calculul acesteia, panta curbei concentrație-răspuns și erorile standard ale acesteia;

— alte efecte biologice observate sau măsurători: se raportează orice alte efecte biologice care au fost observate sau măsurate (de exemplu, creșterea animalelor părinți), inclusiv o justificare corespunzătoare;

— explicarea oricărei abateri de la metoda de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

În scopul acestei metode de testare, se utilizează următoarele definiții:

Mortalitate accidentală: mortalitate care nu este legată de substanța chimică cauzată de un incident accidental (și anume, cauză cunoscută).

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

Cex: concentrația substanței chimice de testat dizolvată în apă care generează o reducere de x la sută a reproducerii la *Daphnia* într-un timp de expunere stabilit.

Mortalitate inadvertentă: mortalitate care nu este legată de substanța chimică, fără o cauză cunoscută.

Rata intrisecă de înmulțire: este o măsură a creșterii populației care cuprinde capacitatea de reproducere și mortalitatea specifică vârstei (1) (2) (3). La populațiile în stare staționară, aceasta va fi egală cu zero. La populațiile în creștere, aceasta va fi pozitivă, iar la populațiile în scădere, aceasta va fi negativă. În mod clar, aceasta din urmă nu este sustenabilă și în final va conduce la extincție.

Limita de detecție: este cea mai mică concentrație care se poate detecta, dar nu se poate măsura.

Limita de determinare: este cea mai mică concentrație care se poate determina cantitativ.

Concentrația la care se observă cele mai mici efecte (CMEO): concentrația cea mai mică testată la care se observă un efect important al substanței chimice din punct de vedere statistic asupra reproducerii și mortalității părinților (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul, într-o perioadă de expunere stabilită. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât CMEO trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la CMEO. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, se prezintă o explicație completă a modului de selectare a CMEO (și, prin urmare, CFEO).

Mortalitate: un animal se înregistrează ca mort atunci când este imobil, și anume atunci când nu poate să înoate sau dacă nu se observă o mișcare a apendicelui sau a post-abdomenului, în 15 secunde de la o ușoară agitare a recipientului de testare. (În cazul în care se utilizează o altă definiție, aceasta se specifică împreună cu sursa bibliografică).

Concentrația la care nu se observă niciun efect (CFEO): concentrația de testare imediat sub CMEO care, în comparație cu martorul, nu are un efect important din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-o perioadă de expunere stabilită.

Descendent: exemplarele tinere de *Daphnia* produse de animalele părinți în cursul testului.

Animale părinți: femelele de *Daphnia* prezente la începutul testului și a căror capacitate de reproducere constituie obiectul studiului.

Capacitate de reproducere: numărul de descendenți în viață produși de animalele părinți în perioada de testare.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Apendicele 2

PREPARAREA MEDIILOR ELENDT M7 ȘI M4 COMPLET DETERMINATE

Adaptarea la mediile Elendt M7 și M4

Unele laboratoare au întâmpinat dificultăți la transferul direct al *Daphnia* în mediile M4 (1) și M7. Cu toate acestea, au fost obținute anumite succese printr-o adaptare treptată, și anume, prin mutarea din mediul propriu la 30 % Elendt, apoi 60 % Elendt și ulterior la 100 % Elendt. Poate fi necesar ca perioadele de adaptare să aibă durata de până la o lună.

Pregătire

Microelemente

Se prepară mai întâi soluții mamă separate (I) ale fiecărui microelement în apă de puritate corespunzătoare, de exemplu deionizată, distilată sau purificată prin osmoză inversă. Din soluțiile mamă menționate (I), se prepară o soluție mamă unică (II), care conține toate microelementele (soluție combinată), și anume:

Soluția (soluțiile) mamă I (o singură substanță)	Cantitate adăugată la apă	Concentrație (în funcție de mediul M4)	Pentru prepararea soluției mamă combinate II, se adaugă următoarea cantitate de soluție mamă I în apă	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 de ori	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 de ori	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 de ori	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 de ori	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 de ori	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 de ori	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000 de ori	1,0	025
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000 de ori	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 de ori	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000 de ori	1,0	1,0
KI	65	20 000 de ori	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 de ori	1,0	1.0
NH4VO3	11,5	20 000 de ori	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000 de ori	-	-
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000 de ori	-	-
Atât soluțiile de Na_2EDTA, cât și de $FeSO_4$ se prepară separat, se toarnă împreună și se autoclavizează imediat. Rezultă:				
Soluție Fe-EDTA		1 000 de ori	20,0	5,0

▼**M7**

Mediile M4 și M7

Mediile M4 și M7 se prepară din soluția mamă II, macroelemente nutritive și vitamine, după cum urmează:

	Cantitate adăugată la apă	Concentrație (în funcție de mediul M4)	Cantitatea de soluție mamă adăugată pentru prepararea mediului	
	mg/l		ml/l	
			M4	M7
Soluție mamă II (microelemente combinate)		20 de ori	50	50
Soluții mamă cu macroelemente nutritive (o singură substanță)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000 de ori	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 de ori	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 de ori	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000 de ori	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 de ori	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 de ori	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 de ori	0,1	0,1
Soluție combinată de vitamine	-	10 000 de ori	0,1	0,1

Soluția mamă combinată de vitamine se prepară prin adăugarea celor 3 vitamine la 1 litru de apă conform indicațiilor prezentate în continuare:

	mg/l			
Clorhidrat de tiamină	750	10 000 de ori		
Cianocobalamină (B_{12})	10	10 000 de ori		
Biotină	7,5	10 000 de ori		

Soluția combinată de vitamine se păstrează înghețată în părți mici. Vitaminele se adaugă în medii cu puțin timp înainte de utilizare.*N.B.:*
Pentru a evita precipitarea sărurilor în timpul preparării mediilor complete, se adaugă părțile de soluții mamă în aproximativ 500-800 ml apă deionizată și apoi se aduce la un litru.*N.N.B.*
Prima semnalare a mediului M4 se poate găsi în Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Apendicele 3

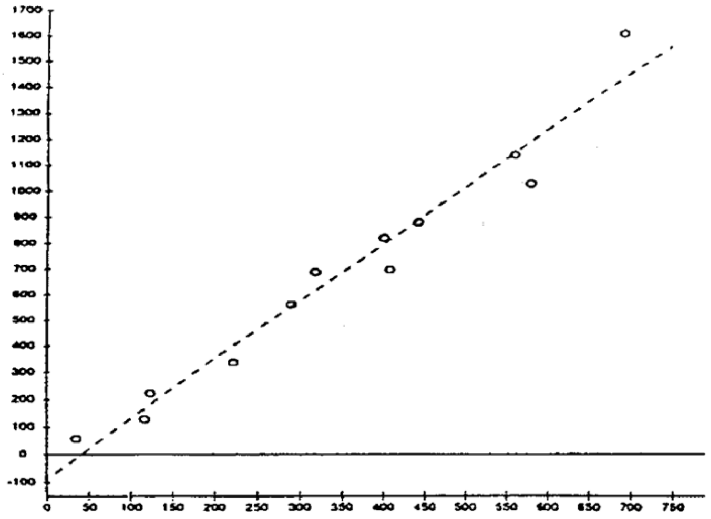
ANALIZA CONȚINUTULUI DE CARBON ORGANIC TOTAL (COT) ȘI REALIZAREA UNEI NOMOGRAME PENTRU CONȚINUTUL COT DIN HRANA PE BAZĂ DE ALGE

Se acceptă ca măsurarea conținutului de carbon din hrana pe bază de alge să nu se măsoare în mod normal direct, ci din corelările (și anume, nomogramele) cu măsurile înlocuitoare precum numărul celulelor de alge sau absorbanța luminii).

Este necesar ca măsurarea COT să se efectueze mai degrabă prin oxidare la temperatură mare decât prin metodele UV sau cu persulfat. (Pentru consultanță, a se vedea: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Pentru obținerea nomogramelor, algele se separă din mediul de cultură prin centrifugare urmată de resuspensie în apă distilată. Se determină parametrul înlocuitor și concentrația COT în fiecare probă de trei ori. Se analizează probele martor în apă distilată și concentrația COT se scade din concentrația COT din proba de alge.

Nomogramele trebuie să fie liniare în intervalul necesar de concentrații ale carbonului. Exemple sunt prezentate în continuare.*NB:*
Acestea nu se utilizează pentru conversiune; este esențial ca laboratoarele să-și elaboreze propriile nomograme.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

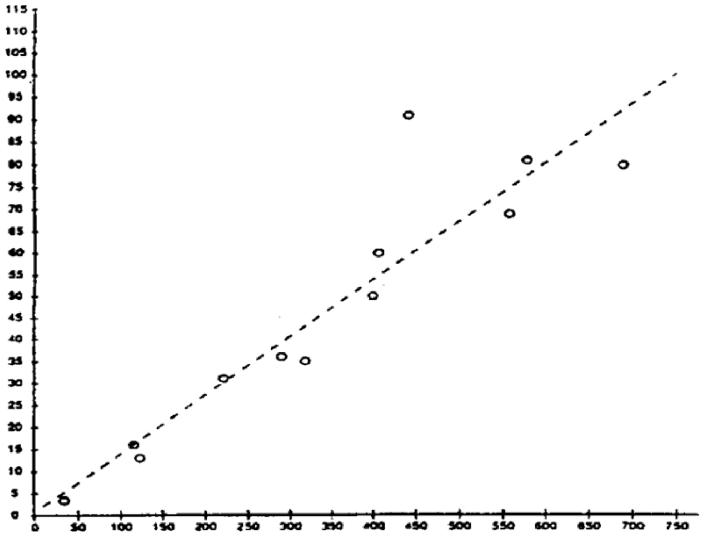
Regresie a mg/l greutate uscată pe mg C/1. Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/1 hrană concentrată din alge

axa y: mg/1 greutate uscată de hrană concentrată din alge

Coeficient de corecție – 0,980

▼**M7**



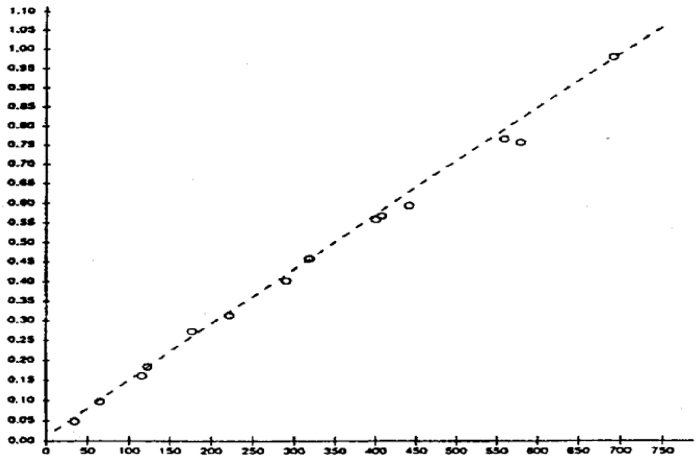
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresia numărului de celule pe mg C/1. Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/1 hrană concentrată din alge

axa y: Nr. celule/1 hrană concentrate din alge

Coeficient de corecție – 0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regresia absorbanței pe mg C/1 (1 cm lungime traseului). Datele din suspensiile concentrate de celule cultivate în loturi semicontinue, resuspendate în apă distilată în apă.

axa x: mg C/1 hrană concentrată din alge

axa y: Absorbanța la 440 mm pentru o diluție de 1/10 a hranei concentrate din alge

Coeficient de corecție – 0,998

▼M7

Apendicele 4

EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA INFORMAȚIILOR PRIVIND REÎNNOIREA MEDIULUI, DATELE CONTROLULUI FIZIC/CHIMIC, ADMINISTRAREA HRANEI, REPRODUCEREA DAFNIEI ȘI MORTALITATEA PARENTALĂ

Nr. experiment:	Început la data:						Clon:			Mediu:				Tipul hranei:				Substanța chimică de testat:					Conc. nominală:	
Ziua	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Reînnoirea mediului (se bifează)																								
pH (*)																							nou	
																							vechi	
O_2 (mg/l) (*)																							nou	
																							vechi	
Temperatura (°C) (*)																							nou	
																							vechi	
Hrana administrată (se bifează)																								
Nr. descendenți în viață (se bifează) (**)																								Total
Vasul 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Nr. experiment:	Început la data:						Clon:			Mediu:				Tipul hranei:				Substanța chimică de testat:					Conc. nominală:	
Ziua	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Moartea cumulativă a părinților (***)																								

(*) Se indică vasul care a fost utilizat pentru experiment
(**) Puii avortați se înregistrează cu „AB” în căsuța relevantă
(***) Se înregistrează mortalitatea oricăror animale părinți cu „M” în căsuța relevantă

▼**M7**

Apendicele 5

EXEMPLU DE FIȘĂ TEHNICĂ PENTRU ÎNREGISTRAREA REZULTATELOR ANALIZEI CHIMICE

(a) **Concentrațiile măsurate**

Conc. nominală	Proba din săptămâna 1		Proba din săptămâna 2		Proba din săptămâna 3	
	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche

(b) **Concentrațiile măsurate sub formă de procente din cea nominală**

Conc. nominală	Proba din săptămâna 1		Proba din săptămâna 2		Proba din săptămâna 3	
	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche	Proaspătă	Veche

▼M7

Apendicele 6

CALCULAREA MEDIEI PONDERATE DE TIMP

Media ponderată de timp

Având în vedere faptul că concentrația substanței chimice de testat poate să scadă în intervalul de timp dintre reînnoiri, este necesar să se aibă în vedere necesitatea alegerii unei concentrații reprezentative pentru domeniul de concentrații experimentate de părintele *Daphnia*. Alegerea se face pe bază de principii biologice, precum și statistice. De exemplu, dacă se consideră că reproducerea este afectată cel mai mult de concentrația de vârf experimentată, atunci se utilizează concentrația maximă. Cu toate acestea, dacă se consideră că efectul acumulat sau pe termen lung al substanței chimice toxice este mai important, atunci o concentrație medie este mai relevantă. În cazul respectiv, o medie potrivită pentru utilizare este concentrația medie ponderată de timp, întrucât aceasta ia în considerare variația concentrației instantanee în timp.

Figura 1

Exemplu de medie ponderată de timp

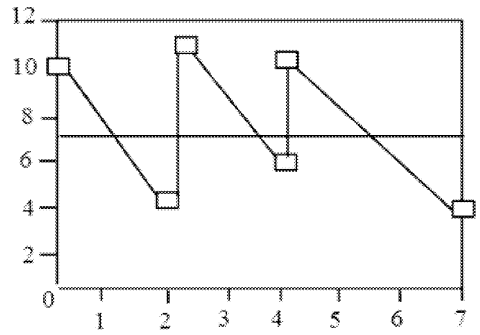


Figura 1 prezintă un exemplu de test (simplificat) cu durata de șapte zile cu reînnoirea mediului în zilele 0, 2 și 4.

— Linia subțire în zig-zag reprezintă concentrația în orice punct în timp. Se consideră că scăderea concentrației este urmarea unui proces de descompunere exponențială.

— Cele șase puncte reprezentate grafic arată concentrațiile observate, măsurate la începutul și la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

— Linia continuă groasă indică poziția mediei ponderate de timp.

Media ponderată de timp se calculează, astfel încât aria de sub media ponderată de timp să fie egală cu aria de sub curba concentrațiilor. Calculul pentru exemplul anterior se prezintă în tabelul 1.

Tabelul 1

Calculul mediei ponderate de timp

Reînnoire Nr.	Zile	Conc. 0	Conc. 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Arie
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼**M7**

Reînnoire Nr.	Zile	Conc. 0	Conc. 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Arie
Total zile:	7				Arie totală:	50,092
					Media PT:	7,156

„*Zile*” este numărul de zile din perioada de reînnoire.

„*Conc 0*” este concentrația măsurată la începutul fiecărei perioade de reînnoire.

„*Conc 1*” este concentrația măsurată la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire.

„*Ln(Conc 0)*” este logaritmul natural al Conc 0.

„*Ln (Conc 1)*” este logaritmul natural al Conc 1.

„*Aria*” este aria de sub curba exponențială pentru fiecare perioadă de reînnoire. Se calculează cu:

$$Aria = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Zi$$

Media ponderată de timp („*media PT*”) este „*Aria totală*” împărțită la „*Total zile*”.

Desigur, pentru testul de reproducere al *Daphnia*, tabelul trebuie mărit până la 21 de zile.

Este clar că, atunci când observațiile se fac numai la începutul și sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, nu se poate confirma că procesul de descompunere este, de fapt, exponențial. O curbă diferită ar genera un calcul diferit pentru „*Arie*”. Cu toate acestea, un proces de descompunere exponențială nu este neverosimil și este probabil cea mai bună curbă de utilizat în absența altor date.

Este necesară însă o oarecare precauție în cazul în care analiza chimică nu reușește să identifice nicio substanță chimică la sfârșitul perioadei de reînnoire. Cu excepția cazului în care este posibil să se estimeze rapiditatea dispariției substanței chimice din soluție, este imposibil să se obțină o arie realistă sub curbă și, prin urmare, este imposibil să se obțină o medie ponderată de timp rezonabilă.

▼M7

Apendicele 7

ORIENTĂRI PENTRU IDENTIFICAREA SEXULUI NOU-NĂSCUTULUI

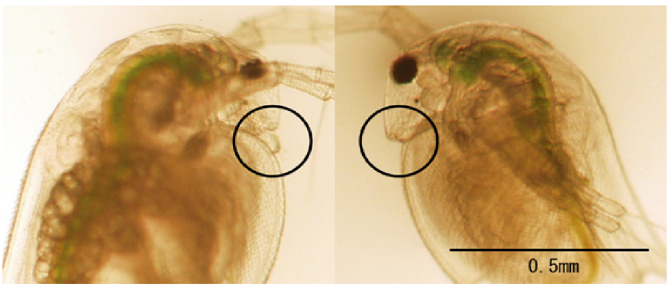
Producția de nou-născuți masculi poate avea loc în condiții de mediu modificate, cum ar fi scurtarea fotoperioadei, temperatura, scăderea concentrației de alimente și mărirea densității populației (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). Producția masculilor de asemenea, este un răspuns cunoscut la anumiți regulatori de creștere a insectelor (Oda *et al*., 2005). În condițiile în care factori de stres chimici determină o scădere a reproducerii descendenților de la femelele partenogenice, se preconizează un număr sporit de masculi (OCDE, 2008). Pe baza informațiilor disponibile, nu este posibil să se estimeze care dintre raportul dintre sexe sau parametrul de reproducere va fi mai sensibil; cu toate acestea, există indicații (referința „raport de validare", partea 1) că o creștere a numărului de masculi ar putea fi mai puțin sensibilă decât descreșterea descendenților. Întrucât obiectivul principal al metodei de testare este evaluarea numărului de descendenți produși, apariția masculilor este o observație opțională. În cazul în care acest parametru opțional este evaluat în cadrul unui studiu, se utilizează un criteriu suplimentar de validare a testului de nu mai mult de 5 % masculi în probele martor.

Modul cel mai practic și ușor de a diferenția sexul *Daphnia* este prin utilizarea caracteristicilor fenotipice ale acestora, având în vedere faptul că masculii și femele sunt identice din punct de vedere genetic și sexul acestora este determinat de mediu. Masculii și femelele sunt diferiți în ceea ce privește lungimea și morfologia primelor antene, care la masculi sunt mai lungi decât la femele (figura 1). Această diferență poate fi recunoscută imediat după naștere, cu toate că, pe măsură ce aceștia cresc, se dezvoltă alte caracteristici sexuale secundare (de exemplu, a se vedea figura 2 în Olmstead și LeBlanc, 2000).

Pentru a observa sexul în mod morfologic, se transferă nou-născuții produși de fiecare animal de experiență cu o pipetă și se introduc într-o placă Petri cu mediu de testare. Mediul este menținut la un nivel minim pentru a limita deplasarea animalelor. Observarea primelor antene se poate realiza cu ajutorul unui stereomicroscop (×10-60).

Fig. 1

Mascul de 24 de ore (stânga) și femelă (dreapta) de *D. magna*. Masculii pot fi diferențiați de femele în funcție de lungimea și morfologia primelor antene, astfel cum se arată în cercuri (Tatarazako *et al*., 2004).



REFERINȚE

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OCDE, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A AZOTULUI

1. METODĂ

Această metodă de testare reia Orientarea 216 (2000) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare constă dintr-o metodă de laborator elaborată pentru studierea efectelor pe termen lung ale substanțelor chimice, după o singură expunere, asupra activității de transformare a azotului de către microorganismele din sol. Testul se bazează în principal pe recomandările emise de Organizația Europeană și Mediteraneană pentru Protecția Plantelor (1). Cu toate acestea, au fost avute în vedere și alte linii directoare, inclusiv cele emise de Biologische Bundesanstalt din Germania (2), de Agenția pentru protecția mediului a Statelor Unite (3) din cadrul SETAC (4) și de Organizația Internațională de Standardizare (ISO) (5). Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (6). Recomandările privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol au la bază liniile directoare ISO (7) și recomandările atelierului de la Belgirate. Pentru determinarea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor de testat este posibil să fie necesară determinarea efectelor acestora asupra activității microbiene din sol, de exemplu dacă sunt necesare date privind potențialele efecte secundare ale produselor fitosanitare asupra microflorei din sol sau în cazul riscurilor de expunere a microorganismelor din sol la alte substanțe chimice decât cele din produsele fitosanitare. Testul de transformare a azotului se efectuează pentru a determina efectele acestor substanțe chimice asupra microflorei din sol. Dacă se testează produse agrochimice (de exemplu produse fitosanitare, îngrășăminte, produse chimice de uz silvic) se efectuează atât testul de transformare a azotului cât și testul de transformare a carbonului. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice este suficient testul de transformare a azotului. Cu toate acestea, dacă valorile CE_{50} obținute în cadrul testului de transformare a azotului pentru substanțele în cauză se încadrează în intervalul de valori caracteristice inhibitorilor de nitrificare disponibili comercial (de exemplu nitrapirin), se poate efectua și un test de transformare a carbonului în vederea obținerii de informații suplimentare.

Solurile sunt formate din componente și vii și din componente non-vii care formează amestecuri complexe și eterogene. Microorganismele joacă un rol important în descompunerea și transformarea materiei organice în sol fertil, multe specii aducându-și contribuția la diferitele aspecte ale fertilizării solurilor. Orice interferență pe termen lung în aceste procese biochimice riscă să perturbe ciclul elementelor nutritive și, în consecință, să altereze fertilitatea solului. Deși coloniile microbiene care determină aceste procese diferă de la un sol la altul, căile de transformare sunt în mare aceleași.

Prezenta metodă de testare descrisă a fost elaborată în vederea detectării efectelor adverse pe termen lung ale unei substanțe asupra procesului de transformare a azotului asupra solurilor aerobe de suprafață. Metoda de test permite și estimarea efectelor substanțelor asupra transformării carbonului de către microflora din sol. Nitratul se formează ca urmare a degradării legăturilor carbon-azot. De aceea, dacă ratele de producere a azotatului pentru solurile tratate și pentru solurile martor sunt identice, este foarte probabil ca principalele căi de degradare a carbonului să fie intacte și funcționale. Raportul carbon-azot din substratul ales pentru test (praf de făină de lucernă) este adecvat (în general între 12/1 și 16/1). Astfel, carențele de carbon sunt reduse pe parcursul testului, iar în cazul în care comunitățile microbiene sunt afectate de o substanță chimică, ele se pot reface în termen de 100 de zile.

▼B

Testele pe baza cărora a fost elaborată această metodă de testare au fost concepute în primul rând pentru cazurile în care cantitatea de substanță care pătrunde în sol poate fi estimată. Este, de exemplu, cazul produselor fitosanitare a căror doză de aplicare pe sol este cunoscută. Pentru produsele agrochimice este suficient un test cu două doze reprezentative pentru aplicarea pe sol anticipată sau estimată. Produsele agrochimice pot fi testate ca principii active (p.a.) sau ca produse preparate. Cu toate acestea, testul nu se limitează la produse agrochimice. Modificând atât cantitatea de substanță de testat aplicată pe sol, cât și modul de evaluare a datelor, testul poate fi utilizat și pentru cazurile în care nu se cunoaște cantitatea de substanță care pătrunde în sol. Astfel, în cazul altor substanțe chimice decât cele din produsele agrochimice, se determină efectele unei serii de concentrații asupra transformării azotului. Datele obținute în cadrul acestor teste se folosesc pentru trasarea curbei doză-efect și pentru calcularea valorilor CE_x unde x se definește ca fiind efectul procentual.

1.2. DEFINIȚII

Transformare a azotului: degradarea finală a materiei organice care conține azot de către microorganisme prin procesele de amonificare și de nitrificare până la produsul final, nitratul anorganic.

CE_x (Concentrația efectivă): este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu x la sută transformarea azotului în nitrat.

CE_{50} (Concentrația mediană efectivă): este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu 50 la sută (50 %) transformarea azotului în nitrat.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Se adaugă praf de făină vegetală în solul cernut, iar apoi fie se tratează cu substanța de testat, fie se lasă netratat (martor). Dacă testul vizează produse agrochimice, se recomandă utilizarea a cel puțin două concentrații, care trebuie alese în funcție de concentrația maximă previzibilă de pe teren. După 0, 7, 14 zile și după 28 de zile de incubare, probele de sol tratate și probele martor sunt supuse extracției cu un solvent adecvat și se determină cantitățile de nitrat din extrase. Rata de formare a nitratului pentru probele tratate se compară cu cea a probelor martor și se calculează deviația procentuală dintre probele tratate și probele martor. Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă în a 28-a zi diferențele dintre solurile tratate și cele netratate sunt mai mari sau egale cu 25 %, se continuă măsurătorile timp de cel mult 100 de zile. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, în probele de sol se adaugă o serie de concentrații ale substanței de testat și se măsoară cantitățile de nitrat formate după 28 de zile de incubare. Rezultatele testelor cu mai multe concentrații se analizează cu ajutorul unui model bazat pe regresie și se calculează valorile CE_x (de exemplu CE_{50}, CE_{25} și/sau CE_{10}). A se vedea definițiile.

1.5. VALABILITATEA TESTULUI

Evaluarea rezultatelor testelor efectuate asupra produselor agrochimice se bazează pe diferențe relativ mici (adică valori medii de ± 25 %) dintre concentrațiile de nitrat din probele martor și din probele de sol tratate, fapt care poate determina obținerea unor rezultate false dacă există variații mari între probele martor. De aceea variațiile dintre probele martor trebuie să fie mai mici de ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Aparatură**

Se folosesc recipiente de testare confecționate din materiale inerte din punct de vedere chimic. Aceste recipiente trebuie să aibă o capacitate adecvată procedurii de incubare a solului utilizate, de exemplu incubare în vrac sau sub forma unei serii de probe individuale (a se vedea punctul 1.7.1.2). Pierderile de apă trebuie reduse la minimum și trebuie să se poată realiza schimbul de gaze (de exemplu, recipientele de testare se pot acoperi cu folie perforată de polietilenă). Dacă se testează substanțe volatile, se folosesc recipiente ermetice și etanșe la gaz. Dimensiunea recipientelor se alege astfel încât numai un sfert din volumul acestora să fie ocupat de proba de sol.

Se folosește echipament standard de laborator, inclusiv următoarele articole:

— agitator: dispozitiv mecanic de amestecare sau echipament echivalent;

— centrifugă (3 000 g) sau dispozitiv de filtrare (cu hârtie de filtru fără nitrați);

— instrument pentru analiza nitraților cu sensibilitate și reproductibilitate adecvată.

1.6.2. **Selectarea solurilor și numărul acestora**

Se folosește un singur sol. Caracteristicile recomandate ale acestuia sunt următoarele:

— conținut de nisip: cel puțin 50 % dar nu mai mult de 75 %;

— pH: 5,5-7,5;

— conținut de carbon organic: 0,5-1,5 %;

— se măsoară biomasa microbiană (8) (9), al cărei conținut de carbon trebuie să reprezinte cel puțin 1 % din carbonul organic total din sol.

În majoritatea cazurilor, un sol cu caracteristicile descrise anterior reprezintă cele mai nefavorabile condiții posibil, deoarece adsorbția substanței de testat este minimă, iar expunerea acesteia la microfloră este maximă. De aceea în general nu este necesar să se efectueze teste pe alte soluri. Cu toate acestea, în anumite situații, dacă principala utilizare preconizată a substanței de testat vizează în special soluri forestiere acide, sau în cazul substanțelor chimice cu sarcină electrostatică, poate fi necesară utilizarea unui sol suplimentar.

▼B

1.6.3. **Prelevarea și depozitarea probelor de sol**

1.6.3.1. *Prelevare*

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale. Locul ales pentru prelevarea solului trebuie să poată fi utilizat pe termen lung. Pășunile permanente, câmpurile plantate cu cereale anuale (cu excepția porumbului) sau semănături dese cu îngrășăminte vegetale sunt adecvate în acest sens. Locul de prelevare selectat trebuie să nu fi fost tratat cu produse fitosanitare timp de cel puțin un an înainte de prelevarea probelor. De asemenea, trebuie să nu fi fost aplicat niciun îngrășământ organic cel puțin pe parcursul ultimelor șase luni. Utilizarea îngrășămintelor minerale este acceptabilă numai dacă respectă cerințele de cultivare și dacă nu se prelevează probe de sol mai repede de trei luni de la aplicarea îngrășământului. Trebuie evitată utilizarea unor soluri tratate cu îngrășăminte cu efecte biocide cunoscute (de exemplu, cianamidă de calciu).

Se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (de peste 30 de zile) de secetă sau de saturare cu apă. În cazul solurilor arate, probele se recoltează de la o adâncime situată între 0 și 20 cm. În cazul pășunilor sau al altor soluri care nu sunt arate pe parcursul unor perioade lungi (cel puțin pe parcursul unei perioade de creștere), adâncimea maximă de prelevare poate fi puțin mai mare de 20 cm (de exemplu, 25 cm).

Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură de natură să garanteze că proprietățile inițiale ale solului nu se modifică în mod semnificativ.

1.6.3.2. *Depozitare*

Este preferabil ca solurile utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren. Dacă nu se poate evita depozitarea în laborator, solurile se depozitează la întuneric, la temperaturi de 4 ± 2 °C timp de maximum trei luni. Pe parcursul depozitării solurilor trebuie asigurate condiții aerobe. Dacă solurile sunt prelevate dintr-o zonă în care sunt afectate de îngheț timp de cel puțin trei luni pe an, se poate avea în vedere depozitarea acestora timp de șase luni la temperaturi între minus 18 °C și minus 22 °C. Biomasa microbiană a solurilor depozitate se măsoară înaintea fiecărui experiment, iar conținutul de carbon din biomasă trebuie să fie de cel puțin 1 % din conținutul total de carbon organic al solului (a se vedea punctul 1.6.2).

1.6.4. **Manipularea și pregătirea solului pentru test**

1.6.4.1. *Preincubarea*

Dacă solul a fost depozitat (a se vedea punctul 1.6.3.2), se recomandă preincubarea timp de 2 până la 28 de zile. Temperatura și conținutul de umiditate al solului din perioada de pre-incubare trebuie să fie similare cu cele din cadrul testului (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Proprietăți fizice și chimice*

Se curăță manual solul de obiectele mari (de exemplu pietre, resturi vegetale etc.) apoi se cerne umed fără uscare excesivă pentru a se obține particule cu o dimensiune mai mică sau egală cu 2 mm. Conținutul de apă al probei de sol se ajustează cu apă distilată sau deionizată până la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei.

1.6.4.3. *Adiționarea cu substrat organic*

Solul se adiționează cu un substrat organic adecvat, de exemplu praf de făină de lucernă verde (component principal: *Medicago sativa*) cu un raport C/N între 12/1 și 16/1. Raportul lucernă-sol recomandat este de 5 g lucernă pe kilogram de sol (greutate uscată).

1.6.5. **Pregătirea substanței de testat pentru aplicarea pe sol**

Substanța de testat se aplică de obicei cu ajutorul unui excipient. Excipientul poate fi reprezentat de apă (în cazul substanțelor solubile în apă) sau de o substanță solidă inertă cum este nisipul cuarțos fin (dimensiunea particulelor: 0,1-0,5 mm). Se vor evita excipienții lichizi alții decât apa (de exemplu solvenții organici cum sunt acetona și cloroformul) deoarece pot afecta microflora. Dacă se folosește nisip ca excipient, acesta poate fi tratat cu substanța de testat dizolvată sau în suspensie într-un solvent adecvat. În acest caz, solventul se elimină prin evaporare înainte de amestecarea excipientului în sol. Pentru distribuirea optimă a substanței de testat în sol, se recomandă un raport de 10 g de nisip pe kilogram de sol (greutate uscată). Probele martor se tratează numai cu o cantitate echivalentă de apă și/sau de nisip cuarțos.

Pentru testarea substanțelor chimice volatile, se evită în cea mai mare măsură posibilă pierderile din perioada tratamentului și se încearcă repartizarea omogenă în sol (de exemplu, substanța de testat se injectează în sol în mai multe locuri).

1.6.6. **Concentrațiile de testare**

Dacă se testează produse agrochimice se folosesc cel puțin două concentrații. Concentrația mai mică trebuie să fie cel puțin egală cu cantitatea maximă susceptibilă să ajungă în sol în condiții reale, iar concentrația maximă trebuie să fie un multiplu al concentrației mai mici. Concentrațiile substanței de testat adăugate în sol se calculează presupunând că încorporarea se realizează uniform, la o adâncime de 5 cm, și că densitatea aparentă a solului este de 1,5. Pentru produsele agrochimice aplicate direct pe sol, sau în cazurile în care cantitatea de substanță chimică ce pătrunde în sol este previzibilă, concentrațiile de testare recomandate sunt concentrația maximă anticipată în mediu (PEC) și o concentrație de cinci ori mai mare. Pentru substanțele care se aplică pe sol de mai multe ori în același sezon, se testează concentrații calculate prin înmulțirea PEC cu numărul maxim de aplicări anticipate. Cu toate acestea, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să depășească de mai mult de zece ori doza maximă aplicată o dată. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosește o serie geometrică de cel puțin cinci concentrații. Concentrațiile testate trebuie să acopere intervalul necesar pentru determinarea valorilor CE_x.

▼B

1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.7.1. **Condiții de expunere**

1.7.1.1 *Lotul tratat și lotul martor*

Dacă se testează produse agrochimice, solul se împarte în trei părți cu greutate egală. Două părți se amestecă cu excipient conținând produsul, iar cealaltă se amestecă cu excipient fără produs (martor). Se recomandă pregătirea a cel puțin trei duplicate, atât pentru solul tratat, cât și pentru cel netratat. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, solul se împarte în șase părți cu greutate egală. Cinci probe se amestecă cu excipient conținând produsul, iar a șasea se amestecă cu excipient fără substanță. Se recomandă pregătirea a trei duplicate atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor. Se va acorda atenție repartizării omogene a substanței de testat în probele de sol tratate. În timpul amestecării se va evita comprimarea sau compactarea solului.

1.7.1.2. *Incubarea probelor de sol*

Incubarea probelor de sol se poate realiza în două moduri: în vrac pentru probele de sol tratat și netratat sau sub forma unor serii de subprobe individuale de dimensiuni identice de sol tratat și netratat. Cu toate acestea, dacă se testează substanțe volatile, testul se efectuează numai pe o serie de subprobe individuale. Dacă solul se incubează în vrac, se prepară cantități mari de sol tratat și netratat și se prelevează subprobe după cum este necesar pe parcursul testului. Cantitatea pregătită inițial atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor depinde de dimensiunea subprobelor, de numărul de duplicate utilizate pentru analiză și de numărul maxim de prelevări preconizat. Solurile incubate în vrac se amestecă bine înainte de prelevarea subprobelor. Dacă solurile se incubează sub forma unor serii de probe individuale, atât solul tratat cât și solul martor se împart în numărul de subprobe necesare, care se folosesc după cum este necesar. Pentru experimentele pentru care se preconizează mai mult de două prelevări se pregătește o cantitate de subprobe suficientă pentru toate duplicatele și pentru toate prelevările. Se incubează în mediu aerob cel puțin trei probe duplicat din solul testat (a se vedea punctul 1.7.1.1). În cadrul tuturor testelor se utilizează recipiente adecvate care asigură suficient spațiu liber pentru a evita apariția unor condiții anaerobe. Dacă se testează substanțe volatile, testul se realizează pe o singură serie de subprobe individuale.

1.7.1.3. *Condițiile de testare și durata testului*

Testul se realizează la întuneric și la o temperatură a camerei de 20 ± 2 °C. Pe parcursul testului conținutul de apă al probei de sol se menține la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei a solului respectiv (a se vedea punctul 1.6.4.2), cu o marjă de ± 5 %. Se poate adăuga apă distilată, deionizată, după cum este necesar.

Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă se testează produse agrochimice, se compară ratele de formare de nitrați în probele tratate și în probele martor. Dacă în a 28-a zi aceste diferențe sunt mai mari de 25 %, testul se continuă până la obținerea unei diferențe de 25 % sau mai mică, sau timp de cel mult 100 de zile. Pentru alte produse decât cele agrochimice, testul este oprit după 28 de zile. În ziua 28 se măsoară cantitățile de nitrat formate în probele de sol tratate și în probele de sol martor și se calculează valorile CE_x.

▼B

1.7.2. **Prelevarea și analiza solurilor**

1.7.2.1. *Programul de prelevare a probelor de sol*

Dacă se testează produse agrochimice, se analizează nitratul din probele de sol în zilele 0, 7, 14 și 28. Dacă este necesară prelungirea testului, după ziua 28 se efectuează măsurători suplimentare la intervale de 14 zile.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosesc cel puțin cinci concentrații și se analizează probele de sol în vederea măsurării nitratului la începutul (ziua 0) și la sfârșitul perioadei de expunere (28 de zile). Dacă se consideră necesar, se poate realiza o măsurătoare suplimentară, de exemplu în ziua 7. Datele obținute în ziua 28 se folosesc pentru determinarea valorii CE_x a substanței chimice. Datele din ziua 0 privind probele martor pot fi utilizate pentru raportarea cantității inițiale de nitrat din sol.

1.7.2.2. *Analiza probelor de sol*

Cantitatea de nitrat formată în fiecare probă tratată și martor duplicat se determină la fiecare prelevare. Nitratul se extrage din sol prin agitarea probelor în prezența unui solvent de extracție, de exemplu o soluție 0,1 M de clorură de potasiu. Se recomandă utilizarea a 5 ml de soluție de KCl pe gram echivalent de greutate uscată de sol. Pentru optimizarea extracției, recipientele care conțin sol și soluție de extracție nu trebuie umplute mai mult de jumătate. Amestecul se agită la 150 rpm timp de 60 de minute. Amestecurile se centrifughează sau se filtrează și se analizează prezența nitratului în faza lichidă. Extractele lichide din care au fost eliminate particulele se pot depozita înainte de a fi supuse analizei la minus 20 ± 5 °C timp de până la șase luni.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Dacă se testează produse agrochimice, se înregistrează cantitatea de nitrat formată în fiecare probă de sol duplicat și se furnizează valorile medii pentru toate duplicatele într-un tabel. Ratele de transformare a azotului se evaluează prin metode statistice adecvate și general acceptate (de exemplu testul F, nivelul semnificativ de 5 %). Cantitățile de nitrat formate se exprimă în mg nitrat/kg greutate uscată/zi. Se compară rata formării de nitrat din fiecare probă tratată cu rata pentru proba martor și se calculează deviația procentuală față de această valoare.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se determină cantitatea de nitrat formată în fiecare duplicat și se trasează curba doză-răspuns în vederea determinării valorilor CE_x. Cantitățile de nitrat (adică mg nitrat/kg greutate uscată de sol) determinate în probele tratate după 28 de zile se compară cu cele determinate pentru proba martor. Pe baza acestor date se calculează valorile de inhibare exprimate procentual pentru fiecare concentrație de testare. Aceste procente sunt reprezentate în funcție de concentrație și se folosesc proceduri statistice pentru calcularea valorilor CE_x. Se determină și pragurile de încredere ($p = 0,95$) pentru CE_x calculate cu ajutorul procedurilor standard (10) (11) (12).

Substanțele de testat care conțin cantități mari de azot pot contribui la formarea de nitrat în timpul testului. Dacă aceste substanțe se testează în concentrații mari (de exemplu, în cazul substanțelor chimice care se anticipează că vor fi utilizate pentru aplicații repetate) trebuie incluși în cadrul testului martori adecvați (de exemplu sol plus substanță de testat, dar nu și făină vegetală). Datele obținute pentru aceste probe martor trebuie luate în considerare la calcularea CE_x.

▼B

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Dacă la evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe agrochimice se constată că diferența dintre ratele de formare a nitratului pentru proba tratată cu concentrația cea mai mică (concentrația maximă previzibilă) și pentru proba martor este, după 28 de zile, mai mică sau egală cu 25 % indiferent de momentul recoltării, se consideră că produsul în cauză nu influențează pe termen lung transformarea azotului în sol. Pentru evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe chimice altele decât produsele agrochimice se folosesc valorile CE_{50}, CE_{25} și/sau CE_{10}.

3. **RAPORT**

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Date complete de identificare a solului utilizat, inclusiv:

— coordonatele geografice ale locului (latitudine, longitudine);

— informații privind istoricul locului (de exemplu, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, contaminările accidentale etc.);

— tipul de utilizare (de exemplu sol agricol, forestier etc.);

— adâncimea de prelevare a probelor (cm);

— conținutul de nisip/aluviuni/argilă (% greutate uscată);

— pH (în apă);

— conținut de carbon organic (% greutate uscată);

— conținut de azot (% greutate uscată);

— concentrație inițială de nitrat (mg nitrat/kg greutate uscată);

— capacitate de schimb de cationi (mmol/kg);

— biomasă microbiană ca procent de carbon organic total;

— metode de referință utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;

— toate informațiile privind prelevarea și depozitarea probelor de sol;

— detalii privind preincubarea solului, dacă este cazul.

Substanța de testat:

— natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice;

— date de identificare a substanțelor chimice, dacă este cazul, inclusiv formula structurală, puritatea (pentru produsele fitosanitare procentul reprezentat de ingredientul activ), conținutul de azot.

Substrat:

— sursa substratului;

— compoziție (făină de lucernă, făină de lucernă verde);

— conținut de carbon, de azot (% greutate uscată);

— dimensiunea sitei (mm).

▼B

Condiții de testare:

— detalii privind adiționarea solului cu substrat organic;

— numărul de concentrații ale substanței de testat utilizate și, dacă este cazul, justificarea concentrațiilor selectate;

— detalii privind aplicarea substanței de testat pe sol;

— temperatura de incubare;

— conținutul de apă al solului la începutul testului și pe parcursul derulării acestuia;

— metoda de incubare a solului utilizată (de exemplu, în vrac sau sub forma unei serii de subprobe individuale);

— numărul de duplicate;

— numărul de prelevări;

— metoda utilizată pentru extragerea nitratului din sol.

Rezultate:

— procedura analitică și echipamentul utilizate pentru analizarea nitratului;

— date sub formă de tabel privind valorile individuale și medii ale măsurătorilor privind nitratul;

— variațiile la nivelul duplicatelor probelor tratate și al duplicatelor probelor martor;

— explicații privind ajustările calculelor, dacă este cazul;

— variația procentuală a ratelor de formare a nitratului la fiecare prelevare sau, dacă este cazul, valoarea CE_{50} cu un prag de încredere de 95 la sută, celelalte valori CE_x (CE_{25} sau CE_{10}) cu pragurile de încredere, și un grafic al curbei doză-răspuns;

— tratamentul statistic aplicat rezultatului;

— toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2. BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3. EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4. SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5. ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

▼B

6. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

7. ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8. ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

9. ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

10. Litchfield, J. T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

11. Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

12. Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICROORGANISMELE DIN SOL: TESTUL DE TRANSFORMARE A CARBONULUI

1. METODĂ

Această metodă de testare reia Orientarea 217 (2000) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare constă dintr-o metodă de laborator elaborată pentru studierea efectelor pe termen lung ale produselor fitosanitare și ale substanțelor chimice, după o singură expunere, asupra activității de transformare a carbonului de către microorganismele din sol. Testul se bazează în principal pe recomandările emise de Organizația europeană și mediteraneană pentru protecția plantelor (1). Cu toate acestea, au fost avute în vedere și alte linii directoare, inclusiv cele emise de Biologische Bundesanstalt din Germania (2) și de Agenția pentru protecția mediului a Statelor Unite (3) din cadrul SETAC (4). Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (5). Recomandările privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol au la bază liniile directoare ISO (6) și recomandările atelierului de la Belgirate.

Pentru determinarea și evaluarea caracteristicilor toxice ale substanțelor de testat, este posibil să fie necesară determinarea efectelor acestora asupra activității microbiene din sol, de exemplu dacă sunt necesare date privind potențialele efecte secundare ale produselor fitosanitare asupra microflorei din sol sau în cazul riscurilor de expunere a microorganismelor din sol la alte substanțe chimice decât cele din produsele fitosanitare. Testul de transformare a carbonului se efectuează pentru a determina efectele acestor substanțe chimice asupra microflorei din sol. Dacă se testează produse agrochimice (de exemplu produse fitosanitare, îngrășăminte, produse chimice de uz silvic) se efectuează atât testul de transformare a carbonului, cât și testul de transformare a azotului. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice este suficient testul de transformare a azotului. Cu toate acestea, dacă valorile CE_{50} obținute în cadrul testului de transformare a azotului pentru substanțele în cauză se încadrează în intervalul de valori caracteristice inhibitorilor de nitrificare disponibili comercial (de exemplu nitrapirin), se poate efectua și un test de transformare a carbonului în vederea obținerii de informații suplimentare.

Solurile sunt formate din componente vii și din componente non-vii care formează amestecuri complexe și eterogene. Microorganismele joacă un rol important în descompunerea și transformarea materiei organice în sol fertil, multe specii aducându-și contribuția la diferitele aspecte ale fertilizării solurilor. Orice interferență pe termen lung în aceste procese biochimice riscă să perturbe ciclul elementelor nutritive și, în consecință, să altereze fertilitatea solului. Transformarea azotului și transformarea carbonului se produc în toate solurile fertile. Deși coloniile microbiene care determină aceste procese diferă de la un sol la altul, căile de transformare sunt în mare aceleași.

▼B

Prezenta metodă de testare a fost elaborată în vederea detectării efectelor adverse pe termen lung ale unei substanțe asupra procesului de transformare a carbonului în solurilor aerobe de suprafață. Testul este sensibil la modificările dimensiunilor și activității coloniilor microbiene care determină transformarea carbonului deoarece supune aceste colonii atât unui stres chimic, cât și unor carențe de carbon. Se folosește un sol nisipos sărac în substanțe organice. Acesta se tratează cu substanța de testat și se incubează în condiții care permit un metabolism microbian rapid. În aceste condiții, sursele de carbon prezente în sol se epuizează rapid. Astfel sunt provocate carențe de carbon care produc moartea celulelor microbiene și induc o stare latentă/sporogeneză. Dacă durata testului depășește 28 de zile, se poate măsura suma acestor reacții la nivelul probelor martor (sol netratat) prin măsurarea dispariției progresive a biomasei microbiene cu activitate metabolică (7). Dacă biomasa dintr-un sol cu carențe de carbon este afectată în cadrul testului de prezența unei substanțe chimice, este posibil ca aceasta să nu ajungă la același nivel ca și proba martor. De aceea este adesea posibil ca perturbările provocate de substanța de testat în orice moment de pe parcursul testului să se mențină până la finalul testului.

Testele pe baza cărora a fost elaborată această metodă de testare au fost concepute în primul rând pentru cazurile în care cantitatea de substanță care pătrunde în sol poate fi estimată. Este, de exemplu, cazul produselor fitosanitare a căror doză de aplicare pe sol este cunoscută. Pentru produsele agrochimice este suficient un test cu două doze reprezentative pentru aplicarea pe sol anticipată sau estimată. Produsele agrochimice pot fi testate ca principii active (p.a.) sau ca produse preparate. Cu toate acestea, testul nu se limitează la produse cu concentrații anticipate în mediu previzibile. Modificând atât cantitatea de substanță de testat aplicată pe sol, cât și modul de evaluare a datelor, testul poate fi utilizat și pentru cazurile în care nu se cunoaște cantitatea de substanță care pătrunde în sol. Astfel, în cazul altor substanțe chimice decât produsele agrochimice, se determină efectele unei serii de concentrații asupra transformării carbonului. Datele obținute în cadrul acestor teste se folosesc pentru trasarea curbei doză-efect și pentru calcularea valorilor $CE_{x,}$ unde x se definește ca fiind efectul procentual.

1.2 DEFINIȚII

Transformare a carbonului: degradarea materiei organice de către microorganisme până la formarea produsului final, dioxidul de carbon.

CE_x (Concentrația efectivă): este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu x la sută transformarea carbonului în dioxid de carbon.

CE_{50} (Concentrația mediană efectivă): este concentrația substanței de testat în sol care inhibă cu 50 la sută (50 %) transformarea carbonului în dioxid de carbon.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Niciuna.

▼B

1.4. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Solul cernut se tratează cu substanța de testat sau se lasă netratat (martor). Dacă testul vizează produse agrochimice, se recomandă utilizarea a cel puțin două concentrații, care trebuie alese în funcție de concentrația maximă previzibilă de pe teren. După 0, 7, 14 zile și 28 de zile de incubație, probele de sol tratate și probele martor se amestecă cu glucoză și se măsoară rata respirației induse de glucoză timp de 12 ore consecutiv. Rata respirației se exprimă ca dioxid de carbon degajat (mg dioxid de carbon/kg sol uscat/h) sau ca oxigen consumat (mg oxigen/kg sol/h). Rata medie de respirație a probelor de sol tratate se compară cu cea a probelor martor și se calculează deviația procentuală dintre probele tratate și probele martor. Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă în a 28-a zi diferențele dintre solurile tratate și cele netratate sunt mai mari sau egale cu 25 %, se continuă efectuarea de măsurători la intervale de 14 zile timp de cel mult 100 de zile. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, în probele de sol se adaugă o serie de concentrații ale substanței de testat și se măsoară ratele de respirație induse de glucoză (de exemplu cantitățile medii de dioxid de carbon format sau de oxigen consumat) după 28 de zile. Rezultatele testelor cu mai multe concentrații se analizează cu ajutorul unui model bazat pe regresie și se calculează valorile CE_x (de exemplu CE_{50}, CE_{25} și/sau CE_{10}). A se vedea definițiile.

1.5. VALABILITATEA TESTULUI

Evaluarea rezultatelor testelor efectuate asupra produselor agrochimice se bazează pe diferențe relativ mici (adică valori medii de ± 25 %) dintre dioxidul de carbon eliberat sau oxigenul consumat în (sau de către) probele martor și probele tratate de sol, fapt care poate determina obținerea unor rezultate false dacă există variații mari între probele martor. De aceea variațiile dintre probele martor trebuie să fie mai mici de ± 15 %.

1.6. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.6.1. **Aparatură**

Se folosesc recipiente de testare confecționate din materiale inerte din punct de vedere chimic. Aceste recipiente trebuie să aibă o capacitate adecvată procedurii de incubare a solului utilizate, de exemplu incubare în vrac sau sub forma unei serii de probe individuale (a se vedea punctul 1.7.1.2). Pierderile de apă trebuie reduse la minimum și trebuie să se poată realiza schimbul de gaze (de exemplu, recipientele de testare se pot acoperi cu folie perforată de polietilenă). Dacă se testează substanțe volatile, se folosesc recipiente ermetice și etanșe la gaz. Dimensiunea recipientelor se alege astfel încât numai un sfert din volumul acestora să fie ocupat de proba de sol.

Pentru determinarea respirației induse de glucoză sunt necesare sisteme de incubare și instrumente de măsurare a producției de dioxid de carbon și a consumului de oxigen. În literatură există exemple de astfel de sisteme și instrumente (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Selectarea solurilor și numărul acestora**

Se folosește un singur sol. Caracteristicile recomandate ale acestuia sunt următoarele:

— conținut de nisip: cel puțin 50 % dar nu mai mult de 75 %;

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— conținut de carbon organic: 0,5-1,5 %;

— se măsoară biomasa microbiană (12) (13), al cărei conținut de carbon trebuie să reprezinte cel puțin 1 % din carbonul organic total din sol.

În majoritatea cazurilor, un sol cu caracteristicile descrise anterior reprezintă cele mai nefavorabile condiții posibil, deoarece adsorbția substanței de testat este minimă, iar expunerea acesteia la microfloră este maximă. De aceea în general nu este necesar să se efectueze teste pe alte soluri. Cu toate acestea, în anumite situații, dacă principala utilizare preconizată a substanței de testat vizează în special soluri de tipul solurilor forestiere acide, sau în cazul substanțelor chimice cu sarcină electrostatică, poate fi necesară utilizarea unui sol suplimentar.

1.6.3. **Prelevarea și depozitarea probelor de sol**

1.6.3.1. *Prelevare*

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale. Locul ales pentru prelevarea solului trebuie să poată fi utilizat pe termen lung. Pășunile permanente, câmpurile plantate cu cereale anuale (cu excepția porumbului) sau semănături dese cu îngrășăminte vegetale sunt adecvate în acest sens. Locul de prelevare selectat trebuie să nu fi fost tratat cu produse fitosanitare timp de cel puțin un an înainte de prelevarea probelor. De asemenea, trebuie să nu fi fost aplicat niciun îngrășământ organic cel puțin pe parcursul ultimelor șase luni. Utilizarea îngrășămintelor minerale este acceptabilă numai dacă respectă cerințele de cultivare și dacă nu se prelevează probe de sol mai repede de trei luni de la aplicarea îngrășământului. Trebuie evitată utilizarea unor soluri tratate cu îngrășăminte cu efecte biocide cunoscute (de exemplu cianamidă de calciu).

Se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (de peste 30 de zile) de secetă sau de saturare cu apă. În cazul solurilor arate, probele se recoltează de la o adâncime situată între 0 și 20 cm. În cazul pășunilor sau al altor soluri care nu sunt arate pe parcursul unor perioade lungi (cel puțin pe parcursul unei perioade de creștere), adâncimea maximă de prelevare poate fi puțin mai mare de 20 cm (de exemplu 25 cm). Probele de sol se transportă în recipiente și în condiții de temperatură de natură să garanteze că proprietățile sale inițiale nu se modifică în mod semnificativ.

1.6.3.2. *Depozitare*

Este preferabil ca solurile utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren. Dacă nu se poate evita depozitarea în laborator, solurile se depozitează la întuneric, la temperaturi de 4 ± 2 ^{o}C timp de maximum trei luni. Pe parcursul depozitării solurilor trebuie asigurate condiții aerobe. Dacă solurile sunt prelevate dintr-o zonă în care sunt afectate de îngheț timp de cel puțin trei luni pe an, se poate avea în vedere depozitarea acestora timp de șase luni la minus 18 ^{o}C. Biomasa microbiană a solurilor depozitate se măsoară înaintea fiecărui experiment, iar conținutul de carbon din biomasă trebuie să fie de cel puțin 1 % din conținutul total de carbon organic al solului (a se vedea punctul 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manipularea și pregătirea solului pentru test**

1.6.4.1. *Preincubarea*

Dacă solul a fost depozitat (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3), se recomandă pre-incubarea timp de 2 până la 28 de zile. Temperatura și conținutul de umiditate al solului în perioada de pre-incubare trebuie să fie similare cu cele din cadrul testului (a se vedea punctele 1.6.4.2 și 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Proprietăți fizice și chimice*

Se curăță manual solul de obiectele mari (de exemplu pietre, resturi vegetale etc.) apoi se cerne umed fără uscare excesivă pentru a se obține particule cu o dimensiune mai mică sau egală cu 2 mm. Conținutul de apă al probei de sol se ajustează cu apă distilată sau deionizată până la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei.

1.6.5. **Pregătirea substanței de testat pentru aplicarea pe sol**

Substanța de testat se aplică de obicei cu ajutorul unui excipient. Excipientul poate fi reprezentat de apă (în cazul substanțelor solubile în apă) sau de o substanță solidă inertă cum este nisipul cuarțos fin (dimensiunea particulelor: 0,1-0,5 mm). Se vor evita excipienții lichizi alții decât apa (de exemplu solvenții organici cum sunt acetona și cloroformul) deoarece pot afecta microflora. Dacă se folosește nisip ca excipient, acesta poate fi tratat cu substanța de testat dizolvată sau în suspensie într-un solvent adecvat. În acest caz, solventul se elimină prin evaporare înainte de amestecarea excipientului în sol. Pentru distribuirea optimă a substanței de testat în sol, se recomandă un raport de 10 g de nisip pe kilogram de sol (greutate uscată). Probele martor se tratează numai cu o cantitate echivalentă de apă și/sau de nisip cuarțos.

Pentru testarea substanțelor chimice volatile, se evită în cea mai mare măsură posibilă pierderile din perioada tratamentului și se încearcă repartizarea omogenă în sol (de exemplu, substanța de testat se injectează în sol în mai multe locuri).

1.6.6. **Concentrațiile de testare**

Dacă se testează produse fitosanitare sau alte produse chimice cu concentrații anticipate în mediu previzibile, se folosesc cel puțin două concentrații. Concentrația mai mică trebuie să fie cel puțin egală cu cantitatea maximă susceptibilă să ajungă în sol în condiții reale, iar concentrația maximă trebuie să fie un multiplu al concentrației mai mici. Concentrațiile substanței de testat adăugate în sol se calculează presupunând că încorporarea se realizează uniform, la o adâncime de 5 cm, și că densitatea aparentă a solului este de 1,5. Pentru produsele agrochimice aplicate direct pe sol, sau în cazurile în care cantitatea de substanță chimică ce pătrunde în sol este previzibilă, concentrațiile de testare recomandate sunt concentrația anticipată în mediu (PEC) și o concentrație de cinci ori mai mare. Pentru substanțele care se aplică pe sol de mai multe ori în același sezon, se testează concentrații calculate prin înmulțirea PEC cu numărul maxim de aplicări anticipate. Cu toate acestea, cea mai mare concentrație testată nu trebuie să depășească de mai mult de zece ori doza maximă aplicată o dată.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosește o serie geometrică de cel puțin cinci concentrații. Concentrațiile testate trebuie să acopere intervalul necesar pentru determinarea valorilor CE_x.

▼B

1.7. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.7.1. **Condiții de expunere**

1.7.1.1. *Lotul tratat și lotul martor*

Dacă se testează produse agrochimice, solul se împarte în trei părți cu greutate egală. Două părți se amestecă cu excipient conținând produsul, iar cealaltă se amestecă cu excipient fără produs (martor). Se recomandă pregătirea a cel puțin trei duplicate, atât pentru solul tratat, cât și pentru cel netratat. Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, solul se împarte în șase părți cu greutate egală. Cinci probe se amestecă cu excipient conținând substanța de testat, iar a șasea se amestecă cu excipient fără substanță. Se recomandă pregătirea a trei duplicate atât pentru probele tratate, cât și pentru probele martor. Se va acorda atenție repartizării omogene a substanței de testat în probele de sol tratate. În timpul amestecării se va evita comprimarea sau compactarea solului.

1.7.1.2. *Incubarea probelor de sol*

Incubarea probelor de sol se poate realiza în două moduri: în vrac pentru probele de sol tratat și netratat sau sub forma unor serii de subprobe individuale de dimensiuni identice de sol tratat și netratat. Cu toate acestea, dacă se testează substanțe volatile, testul se efectuează numai pe o serie de subprobe individuale. Dacă solul se incubează în vrac, se prepară cantități mari de sol tratat și netratat și se prelevează subprobe după cum este necesar pe parcursul testului. Cantitatea pregătită inițial atât pentru probele tratate cât și pentru probele martor depinde de dimensiunea subprobelor, de numărul de duplicate utilizate pentru analiză și de numărul maxim de prelevări preconizat. Solurile incubate în vrac se amestecă bine înainte de prelevarea subprobelor. Dacă solurile se incubează sub forma unor serii de probe individuale, atât solul tratat cât și solul martor se împart în numărul de subprobe adecvat, care se folosesc după cum este necesar. Pentru experimentele pentru care se preconizează mai mult de două prelevări se pregătește o cantitate de subprobe suficientă pentru toate duplicatele și pentru toate prelevările. Se incubează în mediu aerob cel puțin trei probe duplicat din solul testat (a se vedea punctul 1.7.1.1). În cadrul tuturor testelor se utilizează recipiente adecvate care asigură suficient spațiu liber pentru a evita apariția unor condiții anaerobe. Dacă se testează substanțe volatile, testul se realizează pe o singură serie de subprobe individuale.

1.7.1.3. *Condițiile de testare și durata testului*

Testul se realizează la întuneric și la o temperatură a camerei de 20 ± 2 °C. Pe parcursul testului conținutul de apă al probei de sol se menține la o valoare cuprinsă între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de reținere a apei a solului respectiv (a se vedea punctul 1.6.4.2), cu o marjă de ± 5 %. Se poate adăuga apă distilată, deionizată, după cum este necesar.

Toate testele durează cel puțin 28 de zile. Dacă se testează produse agrochimice, se compară cantitățile de dioxid de carbon eliberat de probele tratate și de probele martor. Dacă în a 28-a zi aceste diferențe sunt mai mari de 25 %, testul se continuă până la obținerea unei diferențe de 25 % sau mai mică, sau timp de cel mult 100 de zile. Pentru alte produse decât cele agrochimice, testul este oprit după 28 de zile. În ziua 28 se măsoară cantitățile de dioxid de carbon eliberate sau de oxigen consumat de probele de sol tratate și de probele de sol martor și se calculează valorile CE_x.

▼B

1.7.2. **Prelevarea și analiza solurilor**

1.7.2.1. *Programul de prelevare a probelor de sol*

Dacă se testează produse agrochimice, se analizează ratele respirației induse de glucoză în probele din sol în zilele 0, 7, 14 și 28. Dacă este necesară prelungirea testului, după ziua 28 se efectuează măsurători suplimentare la intervale de 14 zile.

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se folosesc cel puțin cinci concentrații și se analizează probele de sol în vederea măsurării nitratului la începutul (ziua 0) și la sfârșitul perioadei de expunere (28 de zile). Dacă se consideră necesar, se poate realiza o măsurătoare suplimentară, de exemplu în ziua 7. Datele obținute în ziua 28 se folosesc pentru determinarea valorii CE_x a substanței chimice. Datele din ziua 0 privind probele martor pot fi utilizate pentru estimarea cantității inițiale de biomasă microbiană cu activitate metabolică din sol (12).

1.7.2.2. *Măsurarea ratelor de respirație induse de glucoză*

Rata respirației induse de glucoză se determină pentru fiecare probă de sol tratat și pentru fiecare probă martor la fiecare prelevare. Probele de sol se amestecă cu o cantitate de glucoză suficientă pentru a antrena o reacție respiratorie maximă imediată. Cantitatea de glucoză necesară pentru provocarea unei reacții respiratorii maxime într-un anumit sol se poate determina cu ajutorul unui test preliminar cu mai multe concentrații de glucoză (14). Cu toate acestea, în cazul solurilor nisipoase cu un conținut de carbon organic de 0,5-1,5 % sunt de obicei suficiente 2 000-4 000 mg de glucoză pe kg greutate uscată de sol. Glucoza se poate măcina în pulbere cu nisip cuarțos fin (10 g nisip/kg greutate uscată) și se amestecă omogen în sol.

Probele de sol adiționate cu glucoză se incubează într-un aparat adaptat pentru măsurarea continuă a ratei de respirație la fiecare oră sau la fiecare două ore (a se vedea punctul 1.6.1) la 20 ± 2 °C. Se măsoară dioxidul de carbon degajat sau oxigenul consumat timp de 12 ore consecutive, iar măsurătorile se inițiază cât mai repede posibil, adică după 1-2 ore de la adăugarea glucozei. Se măsoară cantitatea totală de dioxid de carbon degajat sau de oxigen consumat pe parcursul a 12 ore și se determină ratele medii de respirație.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Dacă se testează produse agrochimice, se înregistrează cantitatea de dioxid de carbon eliberat sau de oxigen consumat de fiecare probă de sol duplicat și se furnizează valorile medii pentru toate duplicatele într-un tabel. Rezultatele se evaluează prin metode statistice adecvate și general acceptate (de exemplu testul F, nivelul semnificativ de 5 %). Rata de respirație indusă de glucoză se exprimă în mg dioxid de carbon/kg greutate uscată de sol/h sau în mg oxigen/greutate uscată de sol/h. Se compară rata medie a formării dioxidului de carbon sau rata medie a consumului de oxigen pentru fiecare probă tratată cu rata pentru proba martor și se calculează deviația procentuală față de această valoare.

▼B

Dacă se testează alte produse decât cele agrochimice, se determină cantitatea de dioxid de carbon eliberat sau de oxigen consumat de fiecare duplicat și se trasează curba doză-răspuns în vederea determinării valorilor CE_x. Ratele de respirație induse de glucoză (în mg dioxid de carbon/kg greutate uscată de sol/h sau în mg oxigen/greutate uscată de sol/h) determinate în probele tratate după 28 de zile se compară cu cele determinate pentru proba martor. Pe baza acestor date se calculează valorile de inhibare exprimate procentual pentru fiecare concentrație de testare. Aceste procente sunt reprezentate în funcție de concentrație, iar pentru calcularea valorilor CE_x se folosesc proceduri statistice. Se determină și pragurile de încredere ($p = 0,95$) pentru CE_x calculate cu ajutorul procedurilor standard (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Dacă la evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe agrochimice se constată că diferența dintre ratele de respirație induse de glucoză pentru proba tratată cu concentrația cea mai mică (concentrația maximă previzibilă) și pentru proba martor este, după 28 de zile, mai mică sau egală cu 25 % indiferent de momentul recoltării, se consideră că produsul în cauză nu influențează pe termen lung transformarea carbonului în sol. Pentru evaluarea rezultatelor testelor pe substanțe chimice altele decât produsele agrochimice se folosesc valorile CE_{50}, CE_{25} și/sau CE_{10}.

3. **RAPORT**

RAPORTUL DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Date complete de identificare a solului utilizat, inclusiv:

— coordonatele geografice ale locului (latitudine, longitudine);

— informații privind istoricul locului (de exemplu, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu produse fitosanitare, tratamentele cu îngrășăminte, contaminările accidentale etc.);

— tipul de utilizare (de exemplu sol agricol, forestier etc.);

— adâncimea de prelevare a probelor (cm);

— conținutul de nisip/aluviuni/argilă (% greutate uscată);

— pH (în apă);

— conținut de carbon organic (% greutate uscată);

— conținut de azot (% greutate uscată);

— capacitate de schimb de cationi (mmol/kg);

— biomasă microbiană inițială ca procent de carbon organic total;

— metode de referință utilizate pentru determinarea fiecărui parametru;

— toate informațiile privind prelevarea și depozitarea probelor de sol;

— detalii privind pre-incubarea solului, dacă este cazul.

▼B

Substanța de testat:

— natura fizică și, dacă este cazul, proprietățile fizice și chimice;

— date de identificare a substanțelor chimice, dacă este cazul, inclusiv formula structurală, puritatea (pentru produsele fitosanitare procentul de ingredient activ), conținutul de azot.

Condiții de testare:

— detalii privind adiționarea solului cu substrat organic;

— numărul de concentrații ale substanței de testat utilizate și, dacă este cazul, justificarea concentrațiilor selectate;

— detalii privind aplicarea substanței de testat pe sol;

— temperatura de incubație;

— conținutul de apă al solului la începutul testului și pe parcursul derulării acestuia;

— metoda de incubare a solului utilizată (de exemplu în vrac sau sub forma unei serii de subprobe individuale);

— numărul de duplicate;

— numărul de prelevări.

Rezultate:

— metoda și echipamentul utilizate pentru măsurarea ratelor de respirație;

— date sub formă de tabel privind cantitățile individuale și medii de dioxid de carbon sau de oxigen;

— variațiile la nivelul duplicatelor probelor tratate și al duplicatelor probelor martor;

— explicații privind ajustările calculelor, dacă este cazul;

— variația procentuală a ratelor de respirație induse de glucoză la fiecare prelevare sau, dacă este cazul, valoarea CE_{50} cu un prag de încredere de 95 la sută, celelalte valori CE_x (CE_{25} sau CE_{10}) cu praguri de încredere și un grafic al curbei doză-răspuns;

— tratamentul statistic aplicat rezultatelor, dacă este cazul;

— toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals, Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2. BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3. EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

4. SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

6. ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7. Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

8. Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N^{o} 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.

9. ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10. ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11. Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E. A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

12. ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

13. ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

14. Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

15. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

16. Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

17. Finney D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SOL**

1. **METODĂ**

Această metodă de testare reia Orientarea 307 (2002) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Această metodă de testare se bazează pe liniile directoare existente (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metoda descrisă în continuare a fost elaborată pentru măsurarea transformărilor aerobe și anaerobe ale substanțelor chimice în sol. Scopul experimentelor este acela de a determina (i) rata de transformare a substanței de testat și (ii) natura și ratele de formare și de epuizare ale produșilor de transformare la care pot fi expuse plantele și organismele din sol. Aceste studii sunt necesare pentru substanțele chimice aplicate direct pe sol sau susceptibile să ajungă în mediul din sol. Rezultatele acestor studii de laborator pot fi, de asemenea, utilizate pentru elaborarea de protocoale de prelevare de probe și de analiză pentru studii din domenii înrudite.

În general, pentru evaluarea căilor de transformare este suficientă realizarea de studii aerobe și anaerobe pe un singur tip de sol (8) (10) (11). Ratele de transformare se determină pentru încă cel puțin trei alte soluri (8) (10).

Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului și a sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (10). Tipurile de sol testate trebuie să fie reprezentative pentru condițiile de mediu în care va fi utilizată sau eliberată substanța. De exemplu, substanțele chimice eliberate într-un climat subtropical sau tropical se testează cu Ferrasols sau Nitosols (sistemul FAO). În cadrul atelierului de lucru au fost de asemenea formulate recomandări privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sol bazate pe liniile directoare ISO (15). În cadrul acestei metode se studiază și utilizarea solurilor de orezărie.

1.2. DEFINIȚII

Substanță de testat: orice substanță, indiferent dacă este vorba despre substanța mamă sau despre produșii de transformare relevanți.

Produși de transformare: toate substanțele rezultate din reacțiile biotice sau abiotice de transformare a substanței de testat, în special CO_2 și produșii din reziduurile legate.

Reziduuri legate: „reziduurile legate” sunt compuși vegetali sau animali din sol, care persistă în matrice după extracție sub forma substanței mamă sau a metabolitului (metaboliților)/produșilor de transformare ai acesteia. Metoda de extracție nu trebuie să modifice considerabil compușii înșiși sau structura matricei. Natura legăturii poate fi determinată parțial prin metode de extracție care modifică matricea și prin tehnici analitice complexe. Până în prezent a fost identificată în acest mod natura legăturilor covalente, ionice, de sorbție și de captare. În general, formarea reziduurilor legate reduce bioaccesibilitatea și biodisponibilitatea în mod considerabil (12) [modificare IUPAC 1984 (13)].

Transformare aerobă: reacție care se produce în prezența oxigenului molecular (14).

▼B

Transformare anaerobă: reacție care se produce în absența oxigenului molecular (14).

Sol: este un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceștia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu masă moleculară mare, care conțin mici organisme (în special microorganisme). Solul poate fi manipulat în două forme:

(a) nederanjat, așa cum s-a format în timp, în straturile caracteristice unui număr mare de tipuri de sol;

(b) deranjat, așa cum se găsește de obicei pe terenurile arabile când probele se prelevează prin săpare și se folosesc în cadrul prezentei metode de testare (14).

Mineralizare: degradarea completă a unui compus organic în CO_2 și H_2O în condiții aerobe și în CH_4, CO_2 și H_2O în condiții anaerobe. În cadrul prezentei metode de testare, dacă se folosește un compus marcat cu ^{14}C, mineralizare înseamnă o degradare considerabilă pe parcursul căreia un atom de carbon marcat este oxidat, degajându-se o cantitate adecvată de $^{14}CO_2$ (14).

Timp de înjumătățire: $t_{0,5}$ este timpul necesar pentru transformarea a 50 % dintr-o substanță de testat în cazul transformărilor care pot fi descrise printr-o cinetică de prim ordin; nu depinde de concentrație.

DT_{50} (timp de degradare 50): este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 50 %; diferă de timpul de înjumătățire $t_{0,5}$ dacă transformarea nu respectă o cinetică de prim ordin.

DT_{75} (timp de degradare 75): este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 75 %.

DT_{90} (timp de degradare 90): este timpul în care concentrația substanței de testat se reduce cu 90 %.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Substanțele de referință se folosesc pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare prin metode spectroscopice și cromatografice.

1.4. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda se aplică tuturor substanțelor chimice (nemarcate sau marcate radioactiv) pentru care se poate utiliza o metodă analitică cu o precizie și o sensibilitate suficientă. Se aplică pentru compușii ușor volatili, nevolatili, solubili sau insolubili în apă. Testul nu se aplică substanțelor chimice puternic volatile în sol (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care de aceea nu pot fi menținute în sol în condițiile experimentale din cadrul acestui test.

▼B

1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

Pentru măsurarea ratei de transformare se poate utiliza o substanță de testat marcată sau nemarcată. Materialul marcat este necesar pentru studierea căilor de transformare și pentru stabilirea bilanțului masic. Se recomandă marcarea cu ^{14}C dar poate fi utilă și utilizarea altor izotopi cum sunt ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. În măsura în care este posibil, marcajul se amplasează în partea (părțile) cea (cele) mai stabilă (stabile) ale moleculei ([1]). Puritatea substanței de testat trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înainte de efectuarea unui test de transformare aerobă sau anaerobă în sol, sunt necesare următoarele informații privind substanța de testat:

(a) solubilitatea în apă (metoda A.6);

(b) solubilitatea în solvenți organici;

(c) presiunea vaporilor (metoda A.4) și constanta lui Henry;

(d) coeficientul de împărțire n-octanol/apă (metoda A.8);

(e) stabilitatea chimică la întuneric (hidroliză) (metoda C.7);

(f) coeficientul pKa dacă este posibil ca o moleculă să fie supusă unei protonări sau deprotonări (Orientarea 112 a OCDE) (16).

Este posibil să fie utile și informații privind toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor din sol (metodele de testare C.21 și C.22) (16).

Trebuie să fie disponibile metode analitice (inclusiv metode de extracție și de purificare) necesare pentru cuantificarea și identificarea substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia.

1.6. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

Probele de sol se tratează cu substanța de testat și se incubează la întuneric în baloane de tip biometric sau în sisteme cu circulație continuă în condiții de laborator controlate (la temperatură și umiditate constantă). După un interval de timp adecvat, se extrag și se analizează probele de sol în vederea măsurării substanței mamă și a produșilor de transformare. Și produșii volatili se colectează în vederea efectuării unei analize cu ajutorul unor dispozitive de absorbție adecvate. Cu ajutorul materialului marcat cu ^{14}C se pot măsura diferitele rate de mineralizare a substanței de testat prin captarea $^{14}CO_2$ degajat și se poate stabili bilanțul masic, inclusiv formarea reziduurilor legate de sol.

1.7. CRITERII DE CALITATE

1.7.1. **Recuperare**

Extracția și analizarea probelor de sol, cel puțin în duplicat, imediat după adăugarea substanței de testat, oferă o primă indicație privind repetabilitatea metodei analitice și uniformitatea procedurii de aplicare a substanței de testat. Ratele de recuperare din etapele ulterioare ale experimentelor sunt furnizate de bilanțurile masice respective. Aceste rate de recuperare variază între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate (8) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate (3).

([1]) De exemplu, dacă substanța de testat conține un ciclu, acesta trebuie marcat; dacă substanța de testat conține două sau mai multe cicluri, este posibil să fie necesare studii separate pentru evaluarea evoluției fiecărui ciclu și pentru a obține informații fiabile privind formarea produșilor de transformare.

▼B

1.7.2. **Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea unei analize duplicat pe același extract de sol, incubat suficient timp pentru a se forma produșii de transformare.

Pragul de detecție (LOD) a substanței de testat și a produșilor de transformare din cadrul metodei analitice trebuie să fie de cel puțin 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ (substanță de testat) în sol sau de 1 % din doza aplicată, respectiv valoarea mai mică dintre acestea. Se precizează și pragul de cuantificare (LOQ).

1.7.3. **Precizia datelor privind transformarea**

Analiza de regresie a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp oferă informații adecvate privind fiabilitatea curbei de transformare și calcularea pragurilor de încredere pentru timpii de înjumătățire (în cazurile de cinetică de pseudo prim ordin) sau a valorilor DT_{50} și, dacă este cazul, a valorilor DT_{75} și DT_{90}.

1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.8.1. **Echipament și reactivi chimici**

Incubatoarele sunt formate din circuite statice închise sau din sisteme cu circulație continuă (7) (17). În figurile 1 și 2 sunt prezentate exemple de incubatoare cu circulație continuă și de baloane de tip biometric. Ambele tipuri de incubatoare prezintă avantaje și inconveniente (7) (17).

Este necesar echipament standard de laborator, în special următoarele:

— instrumente de analiză cum sunt: cromatografie în fază gazoasă sau lichidă (GLC), cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC), echipament TLC, inclusiv sisteme adecvate pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a substanțelor nemarcate sau metoda diluției izotopice inverse;

— instrumente de identificare (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN etc.);

— contor de scintilație lichid;

— aparat de oxidare pentru combustia materialului radioactiv;

— centrifugă;

— aparat de extracție (de exemplu tuburi de centrifugare pentru extracția la rece și aparat Soxhlet pentru extracția continuă sub reflux);

— instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a extractelor (evaporator rotativ);

— baie de aburi;

— dispozitiv mecanic de amestecare (de exemplu malaxor, amestecător rotativ).

▼B

Printre reactivii chimici utilizați se numără, de exemplu:

— NaOH, puritate analitică, 2 moli· dm^{-3}, sau altă bază adecvată (de exemplu KOH, etanolamină);

— H_2SO_4, puritate analitică, 0,05 moli· dm^{-3},

— etilen glicol, puritate analitică;

— materiale de absorbție solide, de exemplu var sodat sau tampoane poliuretanice;

— solvenți organici, puritate analitică, cum sunt acetona, metanolul etc.;

— lichid de scintilație.

1.8.2. **Aplicarea substanței de testat**

Substanța de testat se poate dizolva în apă (deionizată sau distilată) în vederea încorporării sau a distribuirii în sol, sau, dacă este necesar, se poate dizolva într-o cantitate minimă de acetonă sau de alți solvenți organici (6) dacă este suficient de solubilă și de stabilă. Cu toate acestea, cantitatea de solvent selectată nu trebuie să aibă o influență semnificativă asupra activității microbiene din sol (a se vedea punctele 1.5 și 1.9.2-1.9.3). Trebuie evitată utilizarea unor solvenți care inhibă activitatea microbiană cum sunt cloroformul, diclormetanul și alți solvenți halogenați.

Substanța de testat se poate adăuga și sub formă solidă, amestecată cu nisip cuarțos (6) sau într-o subprobă de sol uscat cu aer și sterilizată de mici dimensiuni. Dacă substanța de testat se adaugă cu ajutorul unui solvent, acesta se lasă să se evaporeze înainte ca subproba tratată să fie adăugată în proba inițială de sol nesterilă.

În cazul substanțelor chimice obișnuite, pentru care principala cale de pătrundere în sol este prin nămolul de epurare sau prin tratamente agricole, se începe prin adăugarea substanței de testat în nămol, care se introduce apoi în proba de sol (a se vedea punctele 1.9.2 și 1.9.3)

Nu se recomandă utilizarea de materiale preparate în mod sistematic. Cu toate acestea, de exemplu în cazul substanțelor puțin solubile, utilizarea de materiale preparate poate fi o soluție bună.

1.8.3. **Soluri**

1.8.3.1. *Selectarea solurilor*

Pentru determinarea căii de transformare se poate utiliza un sol reprezentativ; se recomandă argila nisipoasă sau lutul nisipos fin sau argila sau nisipul lutos [conform clasificării FAO și USDA (18)] cu un pH de 5,5-8,0, cu conținut de carbon organic de 0,5-2,5 % și cu o biomasă microbiană de cel puțin 1 % din carbonul organic total (10).

Pentru studiile privind ratele de transformare se folosesc cel puțin trei soluri suplimentare reprezentative pentru gama de soluri în cauză. Solurile trebuie să aibă pH-uri, conținuturi de argilă și biomase microbiene diferite (10).

▼B

Toate solurile se clasifică, cel puțin din punctul de vedere al texturii (% nisip, % aluviuni, % argilă) [conform clasificării FAO și USDA (18)], al pH-ului, al capacității de schimb de cationi, al densității aparente, al caracteristicilor de reținere a apei ([1]) și al biomasei microbiene (numai pentru studiile aerobe). Pentru interpretarea rezultatelor pot fi utile informații suplimentare privind proprietățile solului. Pentru determinarea caracteristicilor solului se pot utiliza metodele recomandate la referințe (19) (20) (21) (22) (23). Masa microbiană se determină prin metoda respirației induse de substrat (SIR) (25) (26) sau prin metode alternative (20).

1.8.3.2. *Prelevarea, manipularea și depozitarea solurilor*

Se furnizează informații detaliate privind istoricul locului din care se prelevează solul testat. Aceste informații includ localizarea exactă, acoperirea vegetală, date privind tratamentele cu substanțe chimice, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau alte contaminări. Solurile tratate cu substanța de testat sau cu substanțe cu structură analogă pe parcursul ultimilor patru ani nu se folosesc în studiile de transformare (10) (15).

Solurile utilizate trebuie să fie proaspăt prelevate de pe teren (din orizontul A sau din stratul de 20 cm de la suprafață), și trebuie să aibă un conținut de apă care facilitează cernerea. Pentru alte soluri decât cele de orezărie, se va evita prelevarea de probe în timpul sau imediat după perioadele lungi (> 30 zile) de secetă, de îngheț sau de inundații (14). Probele se transportă astfel încât să se reducă la minimum modificările conținutului de apă din sol și se păstrează la întuneric, asigurându-se circulația liberă a aerului în cea mai mare măsură posibil. În acest sens este în general adecvată o pungă de polietilenă care nu se închide ermetic.

Solul se prelucrează cât mai repede posibil după prelevare. Se scot resturile vegetale, animale și pietrele mari înainte de cernerea solului printr-o sită cu ochiuri de 2 mm care reține pietrele și resturile vegetale și animale de mici dimensiuni. Se va evita uscarea și măcinarea solului înainte de cernere (15).

În timpul iernii, când prelevarea de pe teren este dificilă (sol înghețat sau acoperit cu straturi de zăpadă) probele se pot preleva dintr-un lot de sol depozitat într-o seră cu acoperire vegetală (de exemplu un amestec de iarbă și trifoi). Sunt preferate în mod evident studiile efectuate pe sol proaspăt prelevat, dar dacă solul prelevat și prelucrat trebuie depozitat înainte de inițierea studiului, condițiile de depozitare trebuie să fie adecvate iar depozitarea să se realizeze pe parcursul unei perioade limitate (4 ± 2 °C timp de maximum trei luni) pentru menținerea activității microbiene ([2]). Referințele 8, 10, 15, 26 și 27) conțin instrucțiuni detaliate privind prelevarea, manipularea și depozitarea solurilor utilizate în cadrul experimentelor de biotransformare.

([1]) Caracteristica de reținere a apei a unui sol se poate măsura ca fiind capacitatea câmpului, ca fiind capacitatea de reținere a apei sau ca potențial de sucțiune (pF). Pentru explicații a se vedea apendicele 1. În raportul de testare se precizează dacă densitatea aparentă și caracteristica de reținere a apei au fost determinate pe probe de sol nederanjat sau deranjat (prelucrat).

([2]) Cercetări recente au arătat că solurile din zonele cu climat temperat se pot depozita la – 20 °C timp de peste trei luni (18) (29) fără pierderi semnificative la nivelul activității microbiene.

▼B

Înainte de a fi utilizat în cadrul acestui test, solul tratat se preincubează pentru a permite germinarea și eliminarea semințelor și restabilirea echilibrului metabolismului microbian după trecerea de la condițiile de prelevare sau de depozitare la condițiile de incubare. În general este adecvat să se prevadă o perioadă de preincubare de 2 până la 28 de zile, aproximativ în condițiile de temperatură și de umiditate din cadrul testului real (15). În general durata de depozitare și de preincubare însumate nu trebuie să depășească trei luni.

1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.9.1. **Condiții de testare**

1.9.1.1 *Temperatura de testare*

Pe parcursul întregii perioade de testare, solurile se incubează la întuneric, la o temperatură constantă reprezentativă pentru condițiile climatice în care va fi utilizată sau eliberată substanța. Pentru toate substanțele testate care ajung în sol în climat temperat se recomandă o temperatură de 20 ± 2 °C. Temperatura se monitorizează.

În cazul substanțelor aplicate sau eliberate într-un climat mai rece (de exemplu în țările nordice, în perioade de toamnă/iarnă), se incubează probe suplimentare de sol la o temperatură mai mică (de exemplu 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Conținutul de umiditate*

Pentru testele de transformare în mediu aerob, conținutul de umiditate al solului ([1]) se ajustează și se menține la un pF cuprins între 2,0 și 2,5 (3). Conținutul de umiditate al solului se exprimă ca masă de apă pe masă de sol uscat și se controlează în mod regulat (de exemplu la intervale de 2 săptămâni) prin cântărirea balonului de incubare, iar pierderile de apă se compensează prin adăugarea de apă (de preferință apă de la robinet sterilizată prin filtrare). Pierderile de substanță de testat și/sau de produși de transformare prin volatilizare și/sau fotodegradare (dacă este cazul) produse când se adaugă apă se vor evita sau se vor reduce la minimum.

Pentru testele de transformare în condiții aerobe și de orezărie solul se saturează cu apă prin inundare.

1.9.1.3 *Condiții aerobe de incubare*

În sistemele cu circulație continuă condițiile aerobe se mențin prin spălare intermitentă sau ventilare cu aer umezit. În baloanele de tip biometric, schimbul de aer se realizează prin difuziune.

1.9.1.4 *Condiții aerobe sterile*

Pentru obținerea de informații privind importanța transformării abiotice a unei substanțe de testat probele de sol pot fi sterilizate (pentru metode de sterilizare a se vedea referințele 16 și 29), tratate cu o substanță de testat sterilă (de exemplu prin adăugarea de soluție printr-un filtru steril) și aerate cu aer steril umed după cum se arată la punctul 1.9.1.3. În cazul solurilor de orezărie, solul și apa se sterilizează, iar incubarea se efectuează după cum se arată în punctul 1.9.1.6.

([1]) Solul nu trebuie să fie nici prea umed, nici prea uscat, astfel încât să se asigure condiții adecvate de aerare și de nutriție pentru microflora din sol. Conținuturile de umiditate recomandat pentru o creștere microbiană optimă variază între 40-60 % din capacitatea de reținere de apă (WHC) și între 0,1-0,33 bari (6). Acest ultim interval corespunde unui interval de pF de 2,0-2,5. În apendicele 2 sunt prezentate conținuturile tipice de umiditate ale diferitelor tipuri de soluri.

▼B

1.9.1.5. *Condiții anaerobe de incubare*

Pentru crearea și menținerea condițiilor anaerobe, solul tratat cu substanța de testat și incubat în condiții aerobe timp de 30 de zile sau pe parcursul unei perioade egale cu timpul de înjumătățire sau cu DT_{50} (aceea dintre ele care este mai scurtă) se acoperă apoi cu apă (strat de apă de 1-3 cm), iar sistemul de incubare se clătește cu un gaz inert (de exemplu azot sau argon) ([1]). Sistemul de testare trebuie să permită măsurarea pH-ului, a concentrației de oxigen și a potențialului redox și să conțină dispozitive de captare a produșilor volatili. Sistemul de tip biometric trebuie să fie închis pentru a evita orice intrare a aerului prin difuziune.

1.9.1.6. *Condiții de incubare în solurile de orezărie*

Pentru studierea transformării în solurile de orezărie, solul se inundă cu un strat de apă de 1-5 cm iar substanța de testat se introduce în faza apoasă (9). Se recomandă ca adâncimea stratului de sol să fie de cel puțin 5 cm. Sistemul se ventilează cu aer ca și în condiții aerobe. Se supraveghează și se înregistrează pH-ul, concentrația de oxigen și potențialul redox al stratului de apă. Înainte de începerea studiilor de transformare este necesară o perioadă de preincubare de cel puțin două săptămâni (a se vedea punctul 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Durata testului*

În general, studiile privind rata și căile de transformare nu trebuie să depășească 120 de zile ([2]) (3) (6) (8), deoarece după acest termen sistemele artificiale de laborator în care nu se produce o reconstituire naturală sunt afectate în timp de o scădere a activității microbiene din sol. Dacă este necesară o caracterizare a epuizării substanței de testat și a formării și epuizării principalilor produși de transformare, studiile pot fi continuate pe parcursul unor perioade mai lungi (de exemplu între 6 și 12 luni) (8). Dacă se folosesc perioade de incubație mai lungi, acestea trebuie justificate în raportul de testare și trebuie menționate măsurătorile biomasei efectuate în timpul și la sfârșitul acestor perioade.

1.9.2. **Efectuarea testului**

Se introduc 50-200 g de sol (greutate uscată) în fiecare balon de incubare (a se vedea figurile 1 și 2 din apendicele 3) și se tratează cu substanța de testat cu ajutorul uneia dintre metodele descrise în punctul 1.8.2. Dacă pentru aplicarea substanței de testat se folosesc solvenți organici, aceștia se elimină din sol prin evaporare. În continuare, solul se mestecă bine cu o spatulă și/sau prin agitarea balonului. Dacă studiul se desfășoară în condiții de orezărie, solul și apa se amestecă bine după aplicarea substanței de testat. Se analizează substanța de testat prezentă în părți alicote mici (de exemplu 1 g) din solurile tratate pentru a verifica dacă repartizarea este uniformă. În continuare este prezentată o metodă alternativă.

([1]) Condițiile aerobe sunt predominante în solurile de suprafață și chiar în solurile subterane, după cum au arătat rezultatele unui proiect de cercetare finanțat de UE [K. Takagi *et al*. (1992), Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., p. 270-277, 17-21 August, Sigtuna, Suedia]. Producerea condițiilor anaerobe este posibilă ocazional în timpul inundării solurilor după ploi abundente sau în cazul condițiilor de orezărie.

([2]) Studiile aerobe pot fi încheiate în mai puțin de 120 de zile sub rezerva utilizării căii de transformare și a producerii mineralizării efective până la data respectivă. Testul poate fi încheiat după 120 de zile sau când cel puțin 90 % din substanța de testat este transformată, dar numai dacă s-a format cel puțin 5 % CO_2.

▼B

Tratamentul aplicat trebuie să corespundă celei mai mari rate de aplicare a produsului fitosanitar recomandate în instrucțiunile de utilizare și să poată fi încorporat uniform și la o adâncime adecvată în sol de exemplu în stratul ([1]) format de primii 10 cm de la suprafața solului. De exemplu, pentru substanțele chimice aplicate pe frunze sau pe sol care nu sunt încorporate în sol, adâncimea adecvată pentru calcularea cantității de substanță chimică de adăugat în fiecare balon este de 2,5 cm. Pentru substanțele chimice încorporate în sol, adâncimea adecvată este adâncimea de încorporare menționată în instrucțiunile de utilizare. Pentru substanțele chimice obișnuite, doza aplicată se estimează având în vedere cea mai relevantă cale de intrare; de exemplu, dacă cea mai relevantă cale de intrare în sol este prin nămoluri de epurare, substanța chimică se dozează în nămol într-o concentrație egală cu concentrația anticipată din nămol, iar cantitatea de nămol adăugată în sol trebuie să fi egală cu cantitatea de nămol adăugată în mod obișnuit în solurile agricole. Dacă această concentrație nu este suficient de ridicată pentru identificarea principalilor produși de transformare, este utilă incubarea unor probe de sol separate care conțin rate mai mari de substanță, dar trebuie evitate ratele excesive care influențează funcțiile microbiene ale solului (a se vedea punctele 1.5 și 1.8.2).

Ca alternativă, se poate trata un lot mai mare de sol (1-2 kg) cu substanța de testat, amestecându-se bine într-un malaxor adecvat, și se transferă părți mici de 50-200 g în baloane de incubare (de exemplu cu ajutorul unor repartitoare de probe). Se analizează părți alicote mici (de exemplu de 1 g) din lotul de sol tratat pentru a verifica dacă repartizarea substanței de testat este uniformă. Această procedură este preferabilă, deoarece permite o repartizare mai uniformă a substanței de testat în sol.

Se incubează și probe de sol netratate în aceleași condiții (aerobe) ca și probele tratate cu substanța de testat. Aceste probe se utilizează pentru măsurarea biomasei pe parcursul studiilor și la finalul acestora.

Dacă substanța de testat se aplică pe sol dizolvată în unul sau mai mulți solvenți organici, se incubează probe de sol tratate cu aceeași cantitate de solvent sau solvenți în aceleași condiții (aerobe) ca și probele tratate cu substanța de testat. Aceste probe se folosesc pentru măsurarea biomasei la începutul, în timpul și la finalul studiilor pentru a se verifica efectele solventului sau solvenților asupra biomasei microbiene.

Baloanele care conțin sol tratat se conectează la un sistem cu circulație continuă de tipul celui descris în figura 1 sau se închid cu o coloană de absorbție de tipul celei prezentate în figura 2 (a se vedea apendicele 3).

([1]) Calculul concentrației inițiale în funcție de suprafață se realizează pe baza următoarei ecuații:

$$C_{sol}[mg/kg_{sol}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{sol}/m^3]}$$

C_{sol} = Concentrați inițială din sol [mg· kg^{-1}]

A = Rata de aplicare [mg· ha^{-1}]; 1 = grosimea stratului de sol [m]; d = densitatea aparentă a solului uscat [kg· m^{-3}]. Ca regulă generală, o rată de aplicare de 1 kg· ha^{-1} determină o concentrație de aproximativ 1 mg· kg^{-1} într-un strat de 10 cm (presupunând că densitatea aparentă este de g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Prelevare de probe și măsurători**

Se scot baloane de incubare duplicat la intervale adecvate și se extrag probele de sol cu ajutorul unor solvenți adecvați cu polaritate diferită și se analizează în vederea măsurării substanței de testat și/sau a produșilor de transformare. Un studiu bine proiectat include suficiente baloane pentru ca două dintre acestea să poată fi sacrificate la fiecare prelevare. De asemenea, se scot soluții de absorbție sau materiale solide de absorbție la diferite intervale de timp (la intervale de 7 zile în prima lună, iar apoi la intervale de 17 zile) pe parcursul și la sfârșitul perioadei de incubare a fiecărei probe de sol și se analizează produșii volatili. De altfel, pe lângă proba de sol prelevată direct după aplicare (proba din ziua 0) trebuie să mai existe cel puțin 5 puncte suplimentare de prelevare. Intervalele de timp se aleg astfel încât să se poată determina modelul de epuizare pentru substanța de testat și modelele de formare și de epuizare a produșilor de transformare (de exemplu zilele 0, 1, 3, 7; 2, 3 săptămâni; 1, 2, 3 luni etc.).

Dacă substanța de testat este marcată cu ^{14}C, radioactivitatea neextractibilă se cuantifică prin combustie și se calculează un bilanț masic pentru fiecare interval de prelevare.

În cazul incubării anaerobe sau în mediu de orezărie, faza de sol și faza apoasă se analizează împreună în vederea măsurării substanței de testat, iar produșii de transformare se separă prin filtrare sau centrifugare înainte de extracție și de analizare.

1.9.4. **Teste facultative**

Studiile aerobe nesterile la alte temperaturi și umidități ale solului pot fi utile pentru estimarea influenței temperaturii și umidității solului asupra ratelor de transformare a unei substanțe de testat și/sau a produșilor de transformare ai acesteia din sol.

Se poate încerca realizarea unei caracterizări suplimentare a radioactivității neextractibilă utilizându-se, de exemplu, extracția cu un lichid supercritic.

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Cantitățile de substanță de testat, de produși de transformare, de substanțe volatile (exprimate numai în %) și de produși neextractibili se exprimă ca % din concentrația inițială aplicată și, dacă este cazul, ca $mg \cdot kg^{-1}$ de sol (ca greutate uscată a solului) pentru fiecare interval de prelevare. Se furnizează și un bilanț masic exprimat ca procent din concentrația aplicată inițial pentru fiecare interval de prelevare. Reprezentarea grafică a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp permite estimarea timpului de înjumătățire al transformării sau DT_{50}. Se identifică principalii produși de transformare, iar concentrațiile acestora se reprezintă în funcție de timp astfel încât să fie ilustrate ratele de formare și de epuizare ale acestora. Este produs principal de transformare orice produs care reprezintă > 10 % din doza aplicată în orice moment de pe parcursul studiului.

Produsele volatile captate oferă indicații privind potențialul volatil al substanței de testat și produșii de transformare ai acesteia din sol.

▼B

Timpul de înjumătățire sau valorile DT_{50} și, dacă este cazul, valorile DT_{75} și DT_{90} se pot determina cu mai multă precizie utilizându-se metode de calcul bazate pe modele cinetice adecvate. Durata timpului de înjumătățire și valorile DT_{50} sunt incluse în raport, împreună cu o descriere a modelului cinetic utilizat, cu ordinul cineticii și cu coeficientul de determinare (r^2. Este preferabilă cinetica de prim ordin, cu excepția cazurilor în care $r^2 < 0,7$. Dacă este cazul, calculele se aplică și principalilor produși de transformare. Referințele 31-35 conțin exemple de modele adecvate.

În cazul studiilor privind ratele de transformare realizate la diferite temperaturi, acestea sunt descrise în funcție de temperatură în cadrul intervalului experimental de temperatură cu ajutorul relației lui Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{saulnk} = 1nA - \frac{B}{T}$$

unde ln A și B sunt constantele de regresie, respectiv segmentul și panta dreptei de interpolare determinate de regresia liniară a ln k față de 1/T, unde k este constanta de viteză la temperatura T, iar T este temperatura în grade Kelvin. Dacă transformarea depinde de activitatea microbiană, trebuie acordată o atenție specială intervalului limitat de temperaturi în care se aplică relația Arrhenius.

2.2. EVALUAREA ȘI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Deși studiile se realizează într-un sistem artificial de laborator, rezultatele permit estimarea ratei de transformare a substanței de testat, precum și rata de formare și de epuizare a produșilor de transformare în condiții de teren (36) (37).

Studiile asupra căilor de transformare a unei substanțe de testat oferă informații privind modul în care structura substanței aplicate se modifică în sol prin reacții chimice și microbiene.

3. **RAPORT**

RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală [indicându-se poziția marcajului (marcajelor) radioactiv(e) dacă se folosește material marcat radioactiv] și proprietățile fizice și chimice relevante (a se vedea punctul 1.5);

— puritatea (impuritățile) substanței de testat;

— puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

Substanțe de referință:

— denumirea chimică și structura substanțelor de referință utilizate pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare.

Solurile de testare:

— detalii privind locul de colectare;

— data și procedura de prelevare a solului;

▼B

— proprietățile solului cum sunt pH-ul, conținutul de carbon organic, textura (% nisip, % aluviuni, % argilă), capacitatea de schimb de cationi, densitatea aparentă, caracteristicile de reținere a apei și biomasa microbiană;

— durata depozitării solului și condițiile de depozitare (dacă este depozitat).

Condiții de testare:

— datele la care au fost realizate studiile;

— cantitatea de substanță de testat aplicată;

— solvenții utilizați și metoda de aplicare a substanței de testat;

— greutatea solului tratat inițial și prelevat la fiecare interval în vederea analizei;

— descrierea sistemului de incubare utilizat;

— debitul de aer (numai pentru sistemele cu circulație continuă);

— temperatura la începutul experimentului;

— conținutul de umiditate din sol pe parcursul incubării;

— biomasa microbiană inițială, de pe parcursul derulării și de la sfârșitul studiilor aerobe și în condiții de orezărie;

— pH-ul, concentrația de oxigen și potențialul redox inițiale, de pe parcursul derulării și de la sfârșitul studiilor aerobe și în condiții de orezărie;

— metoda (metodele) de extracție;

— metodele de identificare și de cuantificare a substanței de testat și principalii produși de transformare din sol și materialele de absorbție;

— numărul de duplicate și de probe martor.

Rezultate:

— rezultatul determinării activității microbiene;

— repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;

— ratele de recuperare (procentele acceptabile pentru ca un studiu să fie considerat valabil sunt prezentate la punctul 1.7.1);

— tabelul rezultatelor exprimate ca % din doza inițială aplicată și, dacă este cazul, în $mg \cdot kg^{-1}$ de sol (greutate uscată);

— bilanțul masic de pe parcursul și de la începutul studiilor;

— cuantificarea CO_2 degajat și a altor compuși volatili;

— grafice ale concentrațiilor substanței de testat din sol în funcție de timp și, dacă este cazul, grafice pentru produșii importanți de transformare;

— timpul de înjumătățire sau DT_{50}, DT_{75} și DT_{90} pentru substanța de testat și, dacă este cazul, pentru produșii principali de transformare, inclusiv pragurile de încredere;

▼B

— estimarea ratei de degradare abiotică în condiții sterile;

— o evaluare a cineticii de transformare a substanței de testat și, dacă este cazul, a principalilor produși de transformare;

— căile de transformare propuse, dacă este cazul;

— discutarea și interpretarea rezultatelor;

— date brute (de exemplu cromatogramele probelor, calculele privind viteza de transformare a probelor și mijloacele utilizate pentru identificarea produșilor de transformare).

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2. Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3. Uniunea Europeană (UE) (1995). Directiva 95/36/CE din 14 iulie 1995 de modificare a Directivei 91/414/CEE a Consiliului privind introducerea pe piață a produselor fitosanitare, anexa II partea A și anexa III partea A: Transformarea și comportamentul în mediu.

4. Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5. BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6. ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

7. ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8. SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9. MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10. OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

11. Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

12. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

13. T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

14. OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

15. ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16. Anexa V la Directiva 67/548/CEE.

17. Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

18. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

19. Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20. Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21. ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22. Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23. Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24. Anderson, J. P. E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, p. 215-221.

25. ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26. Anderson, J. P. E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, p. 45-60.

27. Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticides, p. 105-120.

28. Keuken O., Anderson J. P. E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, p. 59-63 (SETAC-Europe).

29. Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, p. 68-69 (SETAC-Europe).

30. Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, p. 197-200.

31. Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

32. Hamaker, J. W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 181-199.

33. Goring, C. A. I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R. W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V. H. Freed, Eds., p. 135-172.

34. Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, p. 188-204.

35. Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, p. 47-60.

36. Gustafson D. I., Holden L. R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, p. 1032-1041.

37. Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 83-122.

▼B

Apendicele 1

SUCȚIUNEA, CAPACITATEA CÂMPULUI (FC) ȘI CAPACITATEA DE REȚINERE A APEI (WRC) ([1])

Înălțimea coloanei de apă [cm]	pF ([a])	Bari ([b])	Observații
10^7	7	10^4	Sol uscat
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Punct de ofilire
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	Interval de capacități ale câmpului ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Capacitate de reținere a apei (aproximativă)
1	0	0,001	Sol saturat de apă

([a]) pF = log din valoarea coloanei de apă exprimate în cm.
([b]) 1 bar = 10^5 Pa.
([c]) Corespunde unui conținut aproximativ de apă de 10 % în nisip, de 35 % în aluviuni și de 45 % în argilă.
([d]) Capacitatea câmpului nu este constantă, ci variază în funcție de tipul de sol de la pF 1,5 la 2,5.

Sucțiunea se măsoară în cm coloană de apă sau în bari. Deoarece intervalul valorilor sucțiunii este foarte mare, se exprimă simplu ca valoare pF, adică echivalentul logaritmului din valoarea coloanei de apă exprimată în cm.

Capacitatea câmpului se definește ca fiind cantitatea de apă care poate fi stocată, având în vedere gravitația, de un sol natural după 2 zile de la încheierea unei perioade lungi de ploaie sau după ce a fost irigat suficient. Se determină în sol nederanjat, *in situ,* pe câmp. Această măsurătoare nu se poate realiza pe probe de sol de laborator deranjat. Valorile FC determinate pentru soluri deranjate pot prezenta variații sistematice considerabile.

Capacitatea de reținere a apei (WHC) se determină în laborator pe soluri deranjate și nederanjate prin saturarea unei coloane de sol cu apă prin transport capilar. Este extrem de utilă pentru solurile deranjate și poate fi cu până la 30 % mai mare decât capacitatea câmpului (1). Se determină experimental mai ușor decât se determină valori FC fiabile.

vide

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

Apendicele 2

Conținutul de umiditate (g de apă în 100 g sol uscat) al diferitelor tipuri de sol din diferite țări

Tip de sol	Țara	Conținut de umiditate la		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Nisip	Germania	28,7	8,8	3,9
Nisip lutos	Germania	50,4	17,9	12,1
Nisip lutos	Elveția	44,0	35,3	9,2
Lut nisipos fin	Elveția	72,8	56,6	28,4
Argilă lutoasă	Brazilia	69,7	38,4	27,3
Argilă lutoasă	Japonia	74,4	57,8	31,4
Argilă nisipoasă	Japonia	82,4	59,2	36,0
Lut nisipos fin	Statele Unite	47,2	33,2	18,8
Argilă nisipoasă	Statele Unite	40,4	25,2	13,3

(1) Capacitate de reținere a apei.

▼B

Apendicele 3

Figura 1

Exemplu de aparat cu circulație continuă pentru studiul transformării substanțelor chimice în sol ([1]) ([2])

1: supapă cu ac

2: sticlă de spălare cu gaz care conține apă

3: ultramembrană (numai în condiții sterile), dimensiunea porilor 0,2 µm

4: flacon pentru metabolismul solului (saturat cu apă numai în condiții anaerobe şi de sol de orezărie;)

5: dispozitiv cu etilen glicol pentru captarea compuşilor organici volatili

6: dispozitiv cu acid sulfuric pentru captarea compuşilor alcalini volatili

7, 8: dispozitiv cu hidroxid de sodiu pentru captarea CO_2 şi a compuşilor acizi volatili

9: debitmetru.

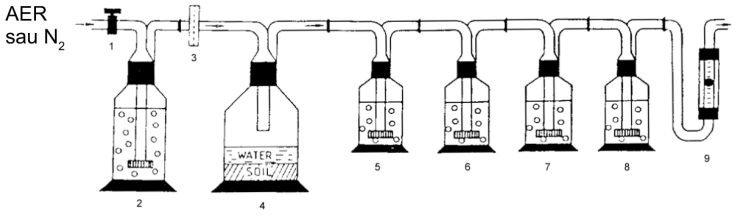
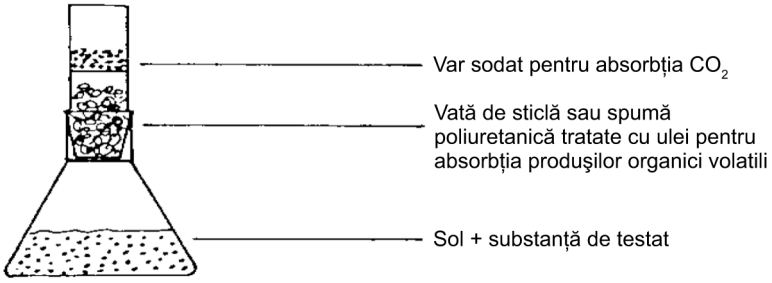


Figura 2

Exemplu de balon de tip biometric pentru studiul transformării substanțelor chimice în sol ([3])



([1]) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, Ed.), Academic Press, p. 123-157.

([2]) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, p. 85-114.

([3]) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, p. 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMĂRI AEROBE ȘI ANAEROBE ÎN SISTEMELE DE SEDIMENTE ACVATICE

1. METODĂ

Această metodă de testare reia Orientarea 308 (2002) a OCDE.

1.1. INTRODUCERE

Substanțele chimice pot intra în apele de suprafață puțin adânci sau foarte adânci pe căi cum sunt aplicarea directă, pierderile la vaporizare, scurgerile, drenarea, eliminarea deșeurilor, efluenții industriali, menajeri sau agricoli și depunerile atmosferice. Această metodă de testare reia o metodă de laborator elaborată pentru măsurarea transformărilor aerobe și anaerobe ale substanțelor chimice din sedimentele acvatice. Se bazează pe liniile directoare existente (1) (2) (3) (4) (5) (6). Numărul și tipul sedimentelor utilizate în cadrul acestui test au fost definite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (7). În cadrul atelierului de lucru au fost de asemenea formulate recomandări privind prelevarea, manipularea și depozitarea probelor de sedimente bazate pe liniile directoare ISO (8). Aceste studii sunt necesare pentru substanțele chimice introduse direct în apă sau care ar putea ajunge în mediul acvatic pe căile descrise anterior.

Faza apoasă superioară a sistemelor naturale de sedimente acvatice asigură de obicei condiții aerobe. Stratul de sediment de la suprafață poate fi atât aerob, cât și anaerob, dar în adâncime sedimentele sunt în general anaerobe. Pentru a reflecta toate aceste posibilități, prezentul document descrie atât teste aerobe, cât și teste anaerobe. Testul aerob constă din simularea unei coloane aerobe de apă peste un strat aerob de sediment și un substrat cu gradient anaerob. Testul anaerob simulează un sistem apă-sediment complet anaerob. Dacă situația impune devieri semnificative de la aceste recomandări, de exemplu prin utilizarea de carote de sediment intact sau de sedimente care este posibil să fi fost expuse la substanța de testat, pot fi utilizate alte metode (9).

1.2. DEFINIȚII

Se folosesc întotdeauna unitățile standard internaționale (SI).

Substanță de testat: orice substanță, indiferent dacă este vorba despre substanța mamă sau despre produșii de transformare relevanți.

Produși de transformare: toate substanțele rezultate din reacțiile biotice sau abiotice de transformare a substanței de testat, în special CO_2 și reziduurile legate.

Reziduuri legate: „reziduurile legate” sunt compuși vegetali sau animali din sol, care persistă în matrice după extracție sub forma substanței mamă sau a metabolitului (metaboliților) acesteia. Metoda de extracție nu trebuie să modifice considerabil compușii înșiși sau structura matricei. Natura legăturii poate fi determinată parțial prin metode de extracție care modifică matricea și prin tehnici analitice complexe. Până în prezent a fost identificată în acest mod natura legăturilor covalente, ionice, de sorbție și de captare. În general, formarea reziduurilor legate reduce bioaccesibilitatea și biodisponibilitatea în mod considerabil (10) [modificare IUPAC 1984 (11)].

▼B

Transformare aerobă: (oxidare): reacție care se produce în prezența oxigenului molecular (12).

Transformare anaerobă: (reducere): reacție care se produce în absența oxigenului molecular (12).

Ape naturale: sunt apele de suprafață obținute din lacuri, râuri, fluvii etc.

Sediment: este un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceştia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu masă moleculară mare. Este depus de apele naturale și formează interfața cu acestea.

Mineralizare: este degradarea completă a unui compus organic în CO_2 și H_2O în condiții aerobe și în CH_4, CO_2 și H_2O în condiții anaerobe. În cadrul prezentei metode de test, dacă se foloseşte un compus marcat radioactiv, mineralizare înseamnă o degradare considerabilă pe parcursul căreia un atom de carbon marcat este oxidat sau redus cantitativ, degajându-se o cantitate adecvată de $^{14}CO_2$ sau respectiv de $^{14}CH_4$.

Timp de înjumătățire: $t_{0,5}$ este timpul necesar pentru transformarea a 50 % dintr-o substanță de testat în cazul transformărilor care pot fi descrise printr-o cinetică de prim ordin; nu depinde de concentrația inițială.

DT_{50} (timp de degradare 50): este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 50 %.

DT_{75} (timp de degradare 75): este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 75 %.

DT_{90} (timp de degradare 90): este timpul în care concentrația inițială a substanței de testat se reduce cu 90 %.

1.3. SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

Pentru identificarea și cuantificarea produşilor prin metode spectroscopice și cromatografice se folosesc substanțe de referință.

1.4. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

Pentru măsurarea ratei de transformare se poate utiliza o substanță de testat marcată sau nemarcată, deşi este preferabil materialul marcat. Materialul marcat este necesar pentru studierea căilor de transformare și pentru stabilirea bilanțului masic. Se recomandă marcarea cu ^{14}C dar poate fi utilă și utilizarea altor izotopi cum sunt ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. În măsura în care este posibil, marcajul se amplasează în partea sau părțile cele mai stabile ale moleculei ([1]). Puritatea chimică și/sau radiochimică a substanței de testat trebuie să fie de cel puțin 95 %.

Înainte de efectuarea unui test sunt necesare următoarele informații privind substanța de testat:

(a) solubilitatea în apă (metoda A.6);

(b) solubilitatea în solvenți organici;

(c) presiunea vaporilor (metoda A.4) și constanta lui Henry;

([1]) De exemplu, dacă substanța de testat conține un ciclu, acesta trebuie marcat; dacă substanța de testat conține două sau mai multe cicluri, este posibil să fie necesare studii separate pentru evaluarea evoluției fiecărui ciclu și pentru a obține informații fiabile privind formarea produșilor de transformare.

▼B

(d) coeficientul de împărțire n-octanol/apă (metoda A.8);

(e) coeficientul de adsorbție (K_d, K_r sau K_{oc}, dacă este cazul) (metoda C.18);

(f) hidroliza (metoda C.7);

(g) constanta de disociere (pKa) [Orientarea 112 a OCDE] (13).

Notă: Se precizează și temperatura la care au fost efectuate aceste măsurători.

Este posibil să fie utile și informații privind toxicitatea substanței de testat asupra microorganismelor din sol, privind biodegradabilitatea imediată și/sau intrinsecă și date privind transformările aerobe și anaerobe din sol.

Trebuie să fie disponibile metode analitice (inclusiv metode de extracție și de purificare) necesare pentru cuantificarea și identificarea substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia din apă și din sedimente (a se vedea punctul 1.7.2).

1.5. PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

În cadrul metodei descrise se folosește un sistem de sedimente acvatice aerobe și anaerobe (a se vedea apendicele 1) care permite:

(i) măsurarea ratei de transformare a substanței de testat într-un sistem apă-sediment;

(ii) măsurarea ratei de transformare a substanței de testat într-un sediment;

(iii) măsurarea ratei de mineralizare a substanței de testat și/sau a produșilor săi de transformare (dacă se folosește o substanță de testat marcată cu ^{14}C);

(iv) identificarea și cuantificarea produșilor de transformare din faza apoasă și din faza sedimentară și în special realizarea bilanțului masic (dacă se testează o substanță marcată);

(v) măsurarea modului de repartizare a substanței de testat și a produșilor de transformare ai acesteia între cele două faze pe parcursul unei perioade de incubare la întuneric (pentru a evita, de exemplu, proliferarea algelor) la o temperatură constantă. Timpul de înjumătățire, valorile DT_{50}, DT_{75} și DT_{90} se determină dacă datele permit acest lucru, dar nu trebuie extrapolate dincolo de perioada experimentală (a se vedea punctul 1.2).

Pentru studiul aerob și respectiv pentru studiul anaerob sunt necesare cel puțin două sedimente și fazele apoase asociate acestora (7). Cu toate acestea, este posibil ca în unele cazuri să fie necesară utilizarea a mai mult de două sedimente acvatice, de exemplu în cazul substanțelor care pot fi prezente în apă dulce și/sau în mediul marin.

▼B

1.6. APLICABILITATEA TESTULUI

Metoda se aplică tuturor substanțelor chimice (nemarcate sau marcate) pentru care se poate utiliza o metodă analitică cu o precizie și o sensibilitate suficientă. Se aplică pentru compușii ușor volatili, nevolatili, solubili sau insolubili în apă. Testul nu se aplică substanțelor chimice puternic volatile în apă (de exemplu fumiganți, solvenți organici) care de aceea nu pot fi menținute în apă și/sau în sedimente în condițiile experimentale din cadrul acestui test.

Metoda a fost utilizată până în prezent pentru studierea transformării substanțelor chimice în ape dulci și în sedimente, dar în principiu poate fi aplicată și sistemelor de estuar/marine. Metoda nu este adecvată pentru simularea condițiilor din ape curgătoare (de exemplu din râuri) sau din largul mării.

1.7. CRITERII DE CALITATE

1.7.1. **Recuperare**

Extracția și analizarea probelor de apă și de sediment, cel puțin în duplicat, imediat după adăugarea substanței de testat, oferă o primă indicație privind repetabilitatea metodei analitice și uniformitatea procedurii de aplicare a substanței de testat. Ratele de recuperare din etapele ulterioare ale experimentelor sunt furnizate de bilanțurile masice respective (dacă se folosește material marcat). Ratele de recuperare variază între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate (6) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate.

1.7.2. **Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea unei analize duplicat pe același extract de apă sau de sediment, incubat suficient timp pentru a se forma produșii de transformare.

Pragul de detecție (LOD) a substanței de testat și a produșilor de transformare din cadrul metodei de analiză trebuie să fie de cel puțin 0,01 mg· kg^{-1} (substanță de testat) în apă sau în sediment sau de 1 % din doza inițială aplicată, respectiv valoarea mai mică dintre acestea. Se precizează și pragul de cuantificare (LOQ).

1.7.3. **Precizia datelor privind transformarea**

Analiza de regresie a concentrațiilor substanței de testat în funcție de timp oferă informații adecvate privind fiabilitatea curbei de transformare și permite calcularea pragurilor de încredere pentru timpii de înjumătățire (în cazurile de cinetică de pseudo prim ordin) sau a valorilor DT_{50} și, dacă este cazul, a valorilor DT_{75} și DT_{90}.

1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.8.1. **Sistemul și aparatura de testare**

Studiul se realizează în recipiente de sticlă (de exemplu sticle, tuburi de centrifugare), cu excepția cazurilor în care informațiile preliminare (coeficientul de împărțire n-octanol/apă, datele privind sorbția etc.) arată că este posibil ca substanța de testat să adere la sticlă, caz în care se poate lua în considerare utilizarea unui alt material (de exemplu Teflon). Dacă se știe că substanța de testat aderă la sticlă, problema poate fi evitată cu ajutorul uneia sau al mai multora dintre următoarele metode:

▼B

— determinarea masei de substanță de testat și/sau de produși de transformare ai acesteia absorbiți pe sticlă;

— spălarea tuturor vaselor de sticlă cu solvent la sfârșitul testului;

— utilizarea unor produse preparate (a se vedea și punctul 1.9.2);

— utilizarea unei cantități mai mari de co-solvent pentru adăugarea substanței de testat în sistem; dacă se folosește un co-solvent, acesta trebuie să nu producă o reacție de solvoliză a substanței de testat.

În apendicele 2 și 3 și în referința 14 sunt prezentate exemple de aparatură de testare tipică (sisteme cu flux continuu și de tip biometru). Alte sisteme utile de incubare sunt descrise la referința 15. Aparatura de experiment trebuie să permită schimbul de aer sau de azot și captarea produșilor volatili. Dimensiunile aparaturii trebuie să permită îndeplinirea cerințelor de testare (a se vedea punctul 1.9.1). Ventilarea se poate realiza fie prin barbotare ușoară, fie prin trecerea de aer sau de azot pe suprafața apei. În al doilea caz se recomandă amestecarea ușoară la suprafața apei pentru obținerea unei mai bune repartizări a oxigenului sau a azotului în apă. Nu se va utiliza aer fără CO_2, deoarece acesta poate provoca o creștere a pH-ului apei. În ambele cazuri, deranjarea sedimentului trebuie evitată în cea mai mare măsură posibil. Substanțele chimice puțin volatile se testează într-un sistem de tip biometru prin amestecarea ușoară a apei de la suprafață. Pentru captarea produșilor volatili se pot utiliza, de asemenea, recipiente închise, cu un spațiu liber umplut fie cu aer atmosferic fie cu azot, și fiole interne (16). În cadrul testelor anaerobe este necesar un schimb regulat de gaz la suprafață pentru compensarea consumului de oxigen de către biomasă.

Pentru captarea produșilor volatili de transformare se pot utiliza, dar nu în mod limitativ, următoarele dispozitive: soluții de 1 mol· dm^{-3} de hidroxid de potasiu sau de hidroxid de sodiu pentru dioxidul de carbon ([1]) și etilen glicol, etanolamină sau parafină 2 % în xilen pentru compuși organici. Produșii volatili formați în condiții anaerobe, cum este metanul, se pot recupera, de exemplu cu ajutorul sitelor moleculare. Acești produși volatili se pot arde, de exemplu până la CO_2, prin trecerea gazului printr-un tub cu cuarț umplut cu CuO la o temperatură de 900 °C și captarea CO_2 format într-o coloană de absorbție conținând produși alcalini (17).

Sunt necesare instrumente de laborator pentru analiza chimică a substanței de testat și a produșilor de transformare [cromatografie în fază gazoasă sau lichidă (GLC), cromatografie în fază lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografie în strat subțire (TLC), spectroscopie de masă (MS), cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS), cromatografie în fază lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS), rezonanță magnetică nucleară (RMN) etc.] precum și, dacă este cazul, dispozitive de detectare a substanțelor chimice marcate radiologic sau nemarcate. Dacă se folosesc substanțe marcate radioactiv, sunt de asemenea necesare un contor de scintilație lichid și un aparat de oxidare pentru combustie (pentru combustia probelor de sediment înainte de analizarea radioactivității).

Pot fi necesare și alte echipamente standard de laborator pentru realizarea analizelor fizico-chimice și biologice (a se vedea tabelul 1 punctul 1.8.2.2), precum și sticlărie, substanțe chimice și reactivi.

([1]) Întrucât aceste soluții alcaline de absorbție absorb atât dioxidul de carbon din aerul utilizat pentru ventilație, cât și pe cel produs prin respirație în cadrul experiențelor aerobe, acestea trebuie înlocuite la intervale regulate pentru a evita saturarea lor și în consecință pierderea capacității de absorbție.

▼B

1.8.2. **Selectarea și numărul de sedimente acvatice**

Locurile de prelevare se selectează în funcție de finalitatea testului în fiecare caz în parte. Pentru alegerea locurilor de prelevare trebuie avut în vedere istoricul eventualelor aporturi de natură agricolă, industrială sau menajeră în bazinul de captare și în apele din amonte. Nu se folosesc sedimente contaminate cu substanța de testat sau cu produși cu structură analogă pe parcursul ultimilor 4 ani.

1.8.2.1. Selectarea sedimentelor

Pentru studiile aerobe se folosesc de obicei două sedimente (7). Cele două sedimente selectate trebuie să fie diferite în ceea ce privește textura și conținutul de carbon organic. Un sediment trebuie să aibă un conținut ridicat de carbon organic (2,5-7,5 %) și textură fină, iar celălalt trebuie să aibă un conținut scăzut de carbon organic (0,5-2,5 %) și o textură grosieră. Diferența dintre conținuturile de carbon organic trebuie să fie de cel puțin 2 %. Prin „textură fină” se înțelege un conținut de [argilă + aluviuni] ([1]) > 50 %, iar prin „textură grosieră” se înțelege un conținut de [argilă + aluviuni] < 50 %. Diferența dintre conținuturile de [argilă + aluviuni] ale sedimentelor trebuie să fie în mod normal mai mare sau egală cu 20 %. Dacă este posibil ca o substanță chimică să ajungă și în ape marine, cel puțin unul dintre cele două sisteme apă-sediment trebuie să fie de origine marină.

Pentru studiile strict anaerobe se prelevează două probe de sediment (precum și faza apoasă asociată) din zonele anaerobe ale sistemelor de ape de suprafață (7). Sedimentele și fazele apoase se manipulează și se transportă cu atenție, evitându-se orice contact cu oxigenul.

Și alți parametri pot fi importanți pentru selectarea sedimentelor și trebuie avuți în vedere în fiecare caz în parte. De exemplu, pH-ul sedimentelor este important pentru testarea substanțelor chimice a căror transformare și/sau sorbție pot să depindă de pH. Dependența sorbției de pH poate fi provocată de pKa a substanței de testat.

1.8.2.2. Caracteristicile probelor de apă-sediment

Parametrii de importanță cheie care se măsoară și se notează în raport (precizându-se metoda utilizată) pentru apă și sediment, precum și etapa testului în care trebuie determinați sunt prezentate în rezumat în tabelul următor. Referințele (18) (19) (20) (21) conțin informații privind metodele de determinare a acestor parametri.

În plus, trebuie măsurați și înregistrați și alți parametri, după caz [pentru apă dulce: particule, alcalinitate, duritate, conductivitate, NO_3/PO_4 (raporturi și valori individuale); pentru sedimente: capacitatea de schimb de cationi, capacitatea de reținere a apei, carbonat, azot și fosfor total; pentru sisteme marine: salinitatea]. Și analiza sedimentelor și a apei în vederea identificării nitratului, sulfatului și a fierului biodisponibil precum și a altor primitori de electroni poate fi utilă pentru evaluarea condițiilor redox, în special în ceea ce privește transformările anaerobe.

([1]) [Argilă + aluviuni] este fracțiunea minerală a sedimentului cu dimensiuni ale particulelor < 50 μm.

▼B

Măsurarea parametrilor caracteristici probelor apă-sediment (7) (22) (23)

Parametru	Etapele procedurii de testare					
	prelevare pe teren	post-manipulare	inițierea aclimatizării	inițierea testului	pe parcursul testului	la finalul testului
Apă						
Origine/sursă	x					
Temperatură	x					
pH	x		x	x	x	x
COT			x	x		x
Concentrație de O_2 (*)	x		x	x	x	x
Potențial redox (*)			x	x	x	x
Sediment						
Origine/sursă	x					
Adâncimea stratului	x					
pH		x	x	x	x	x
Repartizarea dimensiunii particulelor		x				
COT		x	x	x	x	x
Biomasă microbiană (**)		x		x		x
Potențial redox (*)	Observație (culoare/ miros)		x	x	x	x

(*) Conform rezultatelor cercetărilor recente, măsurarea concentrațiilor de oxigen din apă și a potențialului redox nu au nici valoare mecanică, nici valoare predictivă în ceea ce privește creșterea și dezvoltarea coloniilor microbiene în apele de suprafață (24) (25). Determinarea consumului biochimic de oxigen (la prelevare, la începutul și la sfârșitul testului) și a concentrațiilor micro/macro elementelor nutritive Ca, Mg și Mn (la începutul și la sfârșitul testului) în apă și măsurarea N total și P total în sedimente (la prelevare și la sfârșitul testului) pot constitui instrumente mai bune de interpretare și de evaluare a ratelor și a căilor de biotransformare aerobă.

(**) Metoda ratei de respirație microbiene (26), metoda fumigării (27) sau măsurători numerice (bacterii, actinomicete, ciuperci și total colonii) pentru studiile aerobe; rata metanogenezei pentru studiile anaerobe.

1.8.3. **Colectarea, manipularea și depozitarea**

1.8.3.1 *Colectarea*

Pentru prelevarea de probe de sediment se folosește proiectul de linie directoare ISO privind prelevarea sedimentelor de fund (8). Probele de sediment se prelevează din întregul strat superior de 5-10 cm de sediment. Apa asociată se colectează din același loc și în același timp ca și sedimentele. Pentru studiile anaerobe, sedimentele și apa asociată se prelevează și se transportă evitându-se orice contact cu oxigenul (28) (a se vedea punctul 1.8.2.1). Câteva dintre dispozitivele de prelevare sunt descrise în literatură (8) (23).

▼B

1.8.3.2 *Manipulare*

Sedimentul se separă de apă prin filtrare și se trece printr-o sită de 2 mm utilizându-se apa în exces prelevată din același loc, care apoi se elimină. Se amestecă în proporția dorită cantități cunoscute de sedimente și de apă (a se vedea punctul 1.9.1) în flacoane de incubare și se prepară pentru perioada de aclimatizare (a se vedea punctul 1.8.4). În cazul studiului anaerobic, toate etapele de manipulare se efectuează în absența oxigenului (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3 *Depozitare*

Este preferabil ca probele de sediment și apă utilizate să fie proaspăt prelevate de pe teren, dar dacă este necesară depozitarea, sedimentul și apa se cern după cum s-a arătat anterior și se depozitează împreună, sub apă (sub un strat de apă de 6-10 cm), la întuneric, la temperaturi de 4 ± 2 °C timp de maximum 4 săptămâni (7) (8) (23). Probele destinate studiilor aerobe se depozitează astfel încât să beneficieze de un acces nestingherit al aerului (de exemplu în recipiente deschise), iar probele destinate studiilor anaerobe se depozitează în absența oxigenului. Sedimentele și apa nu trebuie să înghețe sau să se usuce în timpul transportului și al depozitării.

1.8.4. **Pregătirea probelor de sediment/apă pentru test**

Înainte de a se adăuga substanța de testat este necesară o perioadă de aclimatizare, pe parcursul căreia fiecare probă de sediment/apă se introduce în recipientul de incubare utilizat pentru testul principal, iar aclimatizarea se realizează exact în aceleași condiții ca și incubarea din cadrul testului (a se vedea punctul 1.9.1). Perioada de aclimatizare reprezintă timpul necesar pentru atingerea unei stabilități suficiente a sistemului în ceea ce privește pH-ul, concentrația de oxigen în apă, potențialul redox al sedimentului și al apei și separarea macroscopică a fazelor. Perioada de aclimatizare durează de obicei între una și două săptămâni și nu mai mult de patru săptămâni. Rezultatul determinărilor realizate pe parcursul acestei perioade se înregistrează.

1.9. DESFĂȘURAREA TESTULUI

1.9.1. **Condiții de testare**

Testul se efectuează într-un dispozitiv de incubare (a se vedea punctul 1.8.1) utilizându-se un raport al volumelor de apă și de sediment între 3:1 și 4:1 și un strat de sediment de 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Se recomandă utilizarea unei cantități de minimum 50 g sediment (greutate uscată) pentru fiecare recipient de incubare.

Testul se realizează la întuneric, la o temperatură constantă din intervalul 10-30 °C. Temperatura recomandată este de (20 ± 2) °C. Dacă este cazul, se pot utiliza temperaturi mai scăzute (de exemplu 10 °C), în funcție de informațiile care trebuie obținute prin test. Temperatura de incubare se controlează și se înregistrează.

([1]) Studii recente au arătat că depozitarea la 4 °C poate determina o scădere a conținutului de carbon organic din sediment care poate duce la reducerea activității microbiene (34).

▼B

1.9.2. **Tratarea și aplicarea substanței de testat**

Se folosește o singură concentrație a substanței de testat ([1]). Pentru produsele fitosanitare aplicate direct în mediul acvatic, se folosește doza maximă indicată în instrucțiunile de utilizare ca rată maximă de aplicare, iar calculele se efectuează având în vedere suprafața de apă din recipientul de test. În toate celelalte cazuri, concentrația care trebuie utilizată se bazează pe estimările privind emisiile din mediu. Concentrația de substanță de testat aplicată trebuie să fie adecvată pentru caracterizarea căii de transformare și a formării și epuizării produșilor de transformare. Este posibil să fie necesară aplicarea unor doze mai mari (de exemplu de 10 ori) în cazurile în care concentrațiile substanței de testat sunt apropiate de limita de detecție la începutul studiului și/sau dacă principalii produși de transformare nu au putut fi detectați cu ușurință la o rată egală cu 10 % din rata de aplicare a substanței de testat. Cu toate acestea, dacă se folosesc concentrații mai mari ale substanței de testat, acestea nu trebuie să aibă un efect advers important asupra activității microbiene din sistemul apă-sediment. Pentru obținerea unei concentrații constante a substanței de testat în recipiente de diferite dimensiuni, poate fi indicată ajustarea cantității de produs aplicat în funcție de adâncimea coloanei de apă din recipient față de adâncimea apei de pe teren (care se presupune a fi de 100 cm, dar se pot utiliza și alte valori). Pentru un exemplu de calcul, a se vedea apendicele 4.

Teoretic, substanța de testat se aplică sub forma unei soluții apoase în faza apoasă a sistemului testat. Dacă nu se poate proceda altfel, se pot utiliza cantități mici de solvenți miscibili în apă (cum sunt acetona sau etanolul) pentru repartizarea și aplicarea substanței de testat, dar aceștia nu trebuie să depășească 1 % v/v și nu trebuie să aibă efecte adverse asupra activității microbiene a sistemului de testare. Soluția apoasă de substanță de testat se prepară cu atenție – pentru a asigura o omogenizare totală se poate efectua o amestecare prealabilă cu ajutorul coloanelor de generator. După adăugarea soluției apoase în sistemul de testare se recomandă amestecarea ușoară a fazei apoase dar deranjând sedimentele cât mai puțin posibil.

În mod obișnuit nu se recomandă utilizarea de produse preparate, deoarece ingredientele preparate pot afecta repartizarea substanței de testat și/sau a produșilor de transformare între faza apoasă și faza sedimentară. Cu toate acestea, în cazul substanțelor puțin solubile în apă, utilizarea de materiale preparate poate constitui o alternativă adecvată.

Numărul de recipiente de incubare depinde de numărul de prelevări (a se vedea punctul 1.9.3). Trebuie prevăzut un număr suficient de sisteme de testare, astfel încât două astfel de sisteme să poată fi sacrificate la fiecare prelevare. Dacă se folosesc unități martor pentru fiecare sistem de sedimente acvatice, acestea nu se tratează cu substanța de testat. Unitățile martor pot fi utilizate pentru determinarea biomasei microbiene din sediment și a carbonului organic total din apă și din sediment la finalul studiului. Două dintre unitățile martor (de exemplu o unitate de martor din fiecare sediment acvatic) pot fi utilizate pentru monitorizarea parametrilor necesari privind sedimentul și apa pe parcursul perioadei de aclimatizare (a se vedea tabelul din punctul 1.8.2.2). Dacă substanța de testat se aplică cu ajutorul unui solvent se adaugă doi martori suplimentari pentru măsurarea efectelor negative asupra activității microbiene din sistemul de testare.

([1]) Efectuarea unui test pentru o a doua concentrație poate fi utilă pentru substanțele chimice care ajung în apele superficiale pe alte căi care determină concentrații considerabil diferite, în măsura în care concentrația cea mai mică poate fi analizată cu suficientă precizie.

▼B

1.9.3. **Durata testului și recoltarea probelor**

Durata experimentului nu trebuie să depășească în mod normal 100 de zile (6) și trebuie să se desfășoare până la stabilirea căilor de degradare și a profilului de repartizare apă/sediment sau până la disiparea a 90 % din substanța de testat prin transformare și/sau volatilizare. Trebuie efectuate cel puțin șase recoltări (inclusiv timpul zero) și se realizează un studiu facultativ preliminar (a se vedea punctul 1.9.4) pentru stabilirea regimului de recoltare și a duratei testului, cu excepția cazurilor în care sunt disponibile din studii anterioare suficiente date privind substanța de testat. Pentru substanțele hidrofobe poate fi necesară instituirea unor puncte suplimentare de prelevare pe parcursul perioadei inițiale pentru determinarea ratei de repartizare între faza apoasă și faza sedimentară.

La fiecare prelevare, se iau pentru analiză recipiente de incubare (duplicat). Sedimentul și apa care îl acoperă se analizează separat ([1]). Se scoate cu atenție apa de la suprafață, evitându-se atingerea sedimentului. Extracția și caracterizarea substanței de testat și a produșilor de transformare se realizează în conformitate cu procedurile analitice adecvate. Se elimină materialele adsorbite pe pereții recipientului de incubare și în tuburile utilizate pentru captarea produșilor volatili.

1.9.4. **Testul preliminar opțional**

Dacă durata și regimul de prelevare a probelor nu pot fi estimate pe baza altor studii relevante asupra substanței de testat, poate fi adecvată efectuarea unui test preliminar în aceleași condiții ca și cele propuse pentru studiul definitiv. Dacă se efectuează acest test preliminar, se descriu pe scurt condițiile experimentale și rezultatele testului.

1.9.5. **Măsurători și analiză**

La fiecare prelevare se măsoară și se înregistrează concentrația substanței de testat și produșii de transformare din apă și din sediment (ca procent și concentrație de substanță aplicată). Ca regulă generală, se identifică toți produșii de transformare pentru care se detectează $\geq$ 10 % din radioactivitatea totală aplicată sistemului apă/sediment, indiferent de prelevare, cu excepția cazurilor în care există justificări rezonabile. Se identifică de asemenea produșii de transformare a căror concentrație crește constant pe durata studiului, chiar și în cazurile în care concentrațiile acestora nu depășesc limitele menționate anterior, deoarece este posibil ca acesta să fie un indiciu asupra persistenței. Procesul verbal trebuie să conțină justificări în acest sens.

Rezultatele privind sistemele de captare a gazelor/produșilor volatili (CO_2 și alții, de exemplu compuși organici volatili) se înregistrează la fiecare prelevare. Se înregistrează și ratele de mineralizare. La fiecare prelevare se menționează și reziduurile (legate) care nu pot fi extrase.

([1]) În cazurile în care este posibil ca produșii rezultați din transformările anaerobe să se reoxideze foarte repede, se asigură condiții anaerobe și în timpul recoltării și al analizei.

▼B

2. **DATE**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

Se calculează bilanțul masic total și recuperarea (a se vedea punctul 1.7.1) radioactivității adăugate pentru fiecare prelevare. Rezultatele se înregistrează ca procent de radioactivitate adăugată. Repartizarea radioactivității între apă și sediment se înregistrează ca procent și concentrație pentru fiecare prelevare.

Se calculează timpii de înjumătățire, valorile DT_{50} și, dacă este cazul, valorile DT_{75} și DT_{90}, precum și pragurile de încredere (a se vedea punctul 1.7.3). Se pot obține informații privind rata de disipare a substanței de testat în apă și în sediment cu ajutorul unor instrumente adecvate de evaluare. Acestea merg de la cinetica de pseudo-prim ordin, tehnici empirice de interpolare care folosesc soluții grafice sau numerice până la alte metode de evaluare care folosesc de exemplu modele cu unul sau mai multe compartimente. Literatura de specialitate conține detalii suplimentare în acest sens (35) (36) (37).

Toate abordările prezintă avantaje și inconveniente, iar complexitatea lor variază considerabil. Ipoteza unei cinetici de prim ordin constituie o simplificare excesivă a procesului de degradare și de repartizare dar, dacă se poate utiliza, oferă un termen (constanta vitezei sau timpul de înjumătățire) ușor de înțeles și foarte util pentru modelele de simulare și pentru calcularea concentrațiilor previzibile din mediu. Este posibil ca metodele empirice sau transformările liniare să producă o mai bună interpolare a curbelor și a datelor și să permită astfel o mai bună estimare a timpilor de înjumătățire, a valorilor DT_{50} și, dacă este cazul, a valorilor DT_{75} și DT_{90}. Cu toate acestea, utilizarea constantelor derivate este limitată. Modelele cu compartimente pot genera constante utile pentru evaluarea riscurilor care descriu viteza de degradare din diferitele compartimente și repartizarea substanței chimice. Acestea se folosesc în general pentru estimarea constantelor de viteză pentru formarea și transformarea principalilor produși de transformare. Metoda aleasă trebuie justificată în toate cazurile, iar experimentatorul trebuie să demonstreze grafic și/sau statistic calitatea de ajustare.

3. **RAPORT**

3.1. RAPORT DE TESTARE

Raportul de testare trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța de testat:

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală (indicându-se poziția marcajului dacă se folosește material marcat radioactiv) și proprietățile fizice și chimice relevante;

— puritatea (impuritățile) substanței de testat;

— puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea molară (dacă este cazul).

▼B

Substanțe de referință:

— denumirea chimică și structura substanțelor de referință utilizate pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare.

Sedimente și apă de testare:

— localizarea și descrierea locului/locurilor din care au fost prelevate sedimentele acvatice și, dacă este posibil, istoricul contaminării;

— orice informații privind recoltarea, depozitarea (dacă este cazul) și aclimatizarea sistemelor apă-sediment;

— caracterizarea probelor apă-sediment în conformitate cu tabelul din punctul 1.8.2.2.

Condiții de testare:

— sistemul de testare utilizat (cu circulație continuă, biometru, mod de ventilare, metodă de amestecare, volum de apă, masă sedimentară, grosime a stratului de apă și a stratului de sediment, dimensiunea recipientelor de testare etc.);

— aplicarea substanței de testat în sistemul de testare: concentrația de testare, numărul de duplicate și martori, modul de aplicare a substanței de testat (de exemplu utilizarea unui solvent, dacă este cazul) etc.;

— temperatura de incubare;

— număr de prelevări;

— metode de extracție, randamente și praguri de detecție și metode analitice;

— metode de caracterizare/identificare a produșilor de transformare;

— devierile de la protocolul de test sau de la condițiile de testare pe parcursul studiului.

Rezultate:

— date brute privind analizele reprezentative (toate datele brute se păstrează în arhivele BPL);

— repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice utilizate;

— ratele de recuperare (valorile procentuale acceptabile pentru ca un studiu să fie considerat valabil sunt prezentate la punctul 1.7.1);

— tabelul rezultatelor exprimate ca % din doza aplicată și în $mg \cdot kg^{-1}$ în apă, sedimente și în întregul sistem (numai %) din substanța de testat și, dacă este cazul, din produșii de transformare și din radioactivitatea neextractibilă;

— bilanțul masic de pe parcursul și de la începutul studiilor;

— reprezentări grafice ale transformării fracțiunilor apă/sediment și ale celor din întregul sistem (inclusiv mineralizarea);

— ratele de mineralizare;

▼B

— timpul de înjumătățire sau valorile DT_{50}, DT_{75} și DT_{90} pentru substanța de testat și, dacă este cazul, pentru produșii principali de transformare, inclusiv pragurile de încredere în apă, sediment și în întregul sistem;

— o evaluare a cineticii de transformare a substanței de testat și, dacă este cazul, a principalilor produși de transformare;

— o cale de transformare propusă, dacă este cazul;

— discutarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2. Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3. MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

4. Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. p. 35-37.

5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6. SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7. OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

8. ISO/DIS 5667-12, (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9. US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10. DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11. T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12. OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13. OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14. Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, p. 149-158.

▼B

15. Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds.), Vol. 1, p. 85-114. J. Wiley & Sons.

16. Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, p. 631-637.

17. Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, p. 661-667.

18. Black, C. A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

19. APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17^{th} edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20. Rowell, D. L. (1994). Soil Science Methods and Applications, Longman.

21. Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, p. 1038-1039.

22. SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.

23. SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24. Vink, J. P. M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, p. 2858-2868.

25. Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, p. 329-338.

26. Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, p. 97-203.

27. ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

28. Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), p. 13-21.

29. Shelton, D. R. and Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Ap. Environ. Microbiol. 47, p. 850-857.

30. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, p. 1527-1550.

31. Pagga, U. and Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, p. 1499-1509.

▼B

32. Nuck, B. A. and Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, p. 3597-3603.

33. US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34. Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, p. 961-968.

35. Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, p.187 – 203.

36. Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, p. 47-60.

37. Carlton, R. R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, p. 1349-1354.

▼B

Apendicele 1

INFORMAȚII PRIVIND SISTEMELE DE TESTARE AEROBE ȘI ANAEROBE

Sistemul aerob de testare

Sistemul aerob de testare descris în prezenta metodă de testare este format dintr-un strat aerob de apă (concentrațiile tipice ale oxigenului variază între 7 și 10 mg· l^{-1}) și dintr-un strat de sediment aerob la suprafață și anaerob sub suprafață [potențialul redox mediu tipic (E_h) din zona anaerobă a sedimentului variază între – 80 și – 90 mV]. În fiecare unitate de incubare se trece aer umed pe suprafața apei pentru a asigura o cantitate suficientă de oxigen în spațiul liber.

Sistemul anaerob de testare

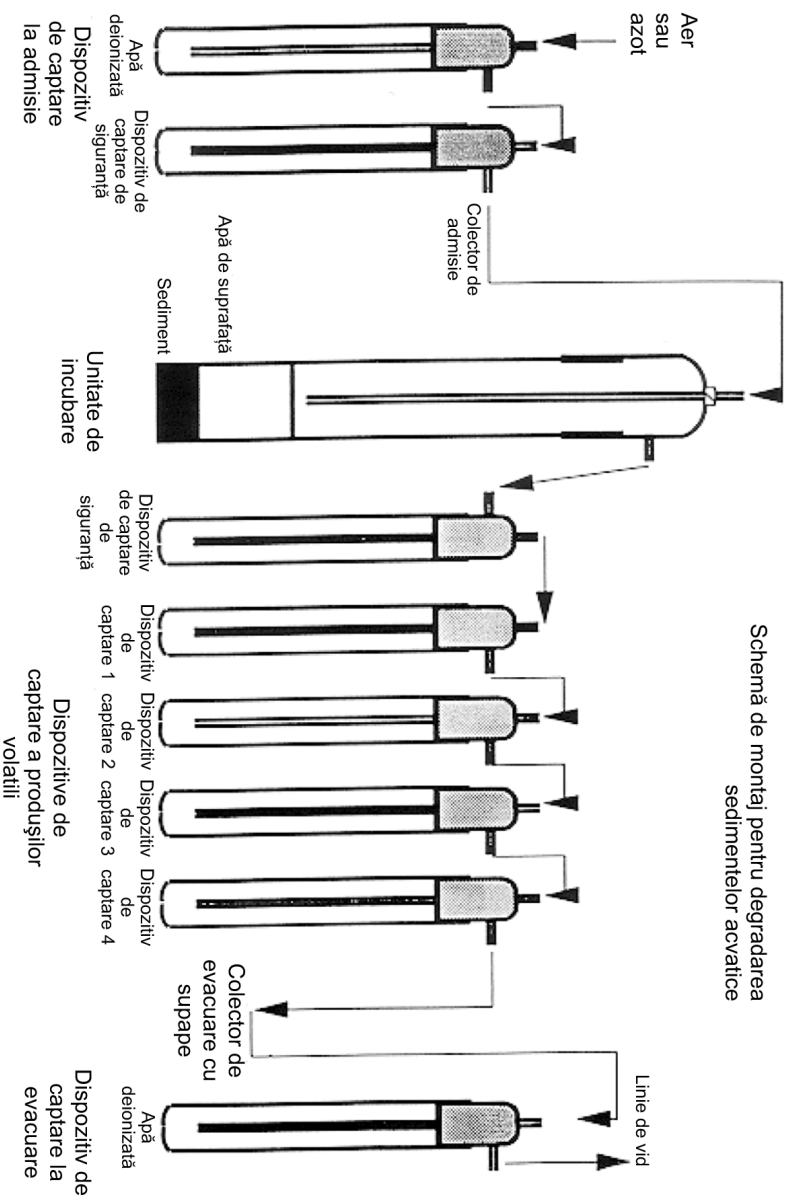
Metoda de test din cadrul sistemului anaerob de testare este practic aceeași cu cea din cadrul sistemului aerob, cu excepția faptului că se trece azot umed pe suprafața apei din fiecare unitate de incubare pentru a crea un spațiu liber cu azot. Sedimentele și apa se consideră anaerobe dacă potențialul redox (E_h) este sub – 100 mV.

În cadrul testului anaerob, evaluarea mineralizării cuprinde măsurarea dioxidului de carbon și a metanului degajat.

▼B

Apendicele 2

EXEMPLU DE APARAT CU CIRCULAȚIE CONTINUĂ

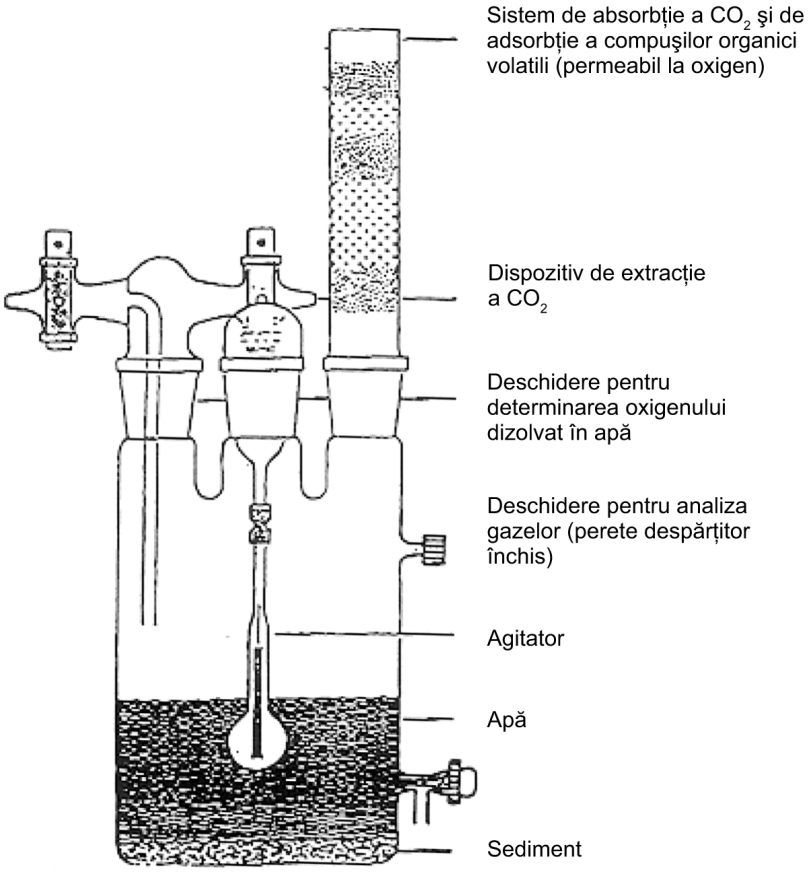


Dispozitiv de captare de siguranță, gol
Dispozitivul de captare 1:
etilenglicol pentru captarea compuşilor organici volatili
Dispozitivul de captare 2:
acid sulfuric 0,1M pentru captarea compuşilor alcalini volatili
Dispozitivele de captare 3 şi 4:
hidroxid de sodiu 2M pentru captarea CO_2 şi a altor compuşi volatili acizi

▼B

Apendicele 3

EXEMPLU DE BIOMETRU



▼B

Apendicele 4

EXEMPLU DE CALCULARE A DOZEI APLICATE RECIPIENTULUI DE TESTARE

Diametrul intern al cilindrului:	= 8 cm
Adâncimea coloanei de apă, fără sediment:	= 12 cm
Suprafață: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Rata de aplicare: 500 g substanță de testat/ha înseamnă 5 $\mu g/cm^2$	
Total în µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Ajustarea cantității pentru o adâncime de 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Volumul coloanei de apă: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Concentrația în apă: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml sau µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZAREA AEROBĂ ÎN APA DE SUPRAFAȚĂ – TEST DE SIMULARE A BIODEGRADĂRII

1. METODĂ

Această metodă este echivalentă cu orientările OECD privind testele nr. 309 (2004)(1)

1.1. INTRODUCERE

Obiectivul acestui test vizează măsurarea în timp a biodegradării unei substanțe de testat la concentrație scăzută în apă aerobă în mod natural și cuantificarea observațiilor sub formă de expresii cinetice. Acest test de simulare este un test de laborator în serie prin metoda agitării flaconului pentru determinarea vitezelor de biodegradare aerobă a substanțelor organice în eșantioane de apă naturală de suprafață (dulce, salmastră sau marină). Se bazează pe ISO/DIS 14592-1 (2) și include, de asemenea, elemente ale metodelor de testare C.23 și C.24 (3)(4). Opțional, dacă perioada de testare este lungă, testarea în loturi se înlocuiește cu testarea semicontinuă, în scopul prevenirii deteriorării mediului de testare. Principalul obiectiv al testului de simulare constă în determinarea mineralizării substanței testate în apă de suprafață, iar mineralizarea constituie baza de exprimare a cineticii degradării. Un obiectiv opțional secundar al testului vizează obținerea de informații privind degradarea primară și formarea produșilor principali de transformare. Identificarea produșilor de transformare și, dacă este posibil, cuantificarea concentrațiilor acestora sunt importante în special pentru substanțe care se mineralizează foarte lent (de exemplu, cu perioade de înjumătățire pentru ^{14}C rezidual total care depășesc 60 de zile). Ca urmare a limitărilor analitice, pentru identificarea și cuantificarea produșilor principali de transformare se folosesc, în mod normal, concentrații mai mari de substanță de testat (> 100 μg/l).

O concentrație scăzută în acest test se referă la o concentrație (de exemplu mai mică de 1 μg/l la 100 μg/l) suficient de scăzută pentru ca cinetica biodegradării rezultate în urma testului să o reflecte pe cea prevăzută pentru mediul ambiant. Comparativ cu masa totală a substraturilor de carbon biodegradabil disponibile în apa naturală folosită pentru testare, substanța testată prezentă în concentrație scăzută va avea rolul de substrat secundar. Aceasta presupune că cinetica anticipată a biodegradării este de prim ordin (cinetică de „non-creștere”), iar substanța testată poate fi degradată prin „cometabolism”. Cinetica de prim ordin presupune că viteza de degradare (mg/l/zi) este proporțională cu concentrația substratului care descrește în timp. În cazul cineticii de prim ordin reale, constanta vitezei specifice de degradare k este independentă de timp și concentrație. Prin urmare, k nu variază apreciabil în cursul experimentului și nu se modifică în funcție de concentrația adăugată între experimente. Prin definiție, constanta vitezei specifice de degradare este egală cu modificarea relativă a concentrației în funcție de timp $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Deși, în condițiile descrise, se prevede obținerea unei cinetici de prim ordin, se pot manifesta circumstanțe în care este adecvată o cinetică de un tip diferit. Dacă viteza de biotransformare este limitată ca urmare a unor fenomene de transfer de masă, cum ar fi viteza de difuzie, în locul vitezei reacției biologice, pot fi observate abateri de la cinetica de prim ordin. Cu toate acestea, datele pot fi aproape întotdeauna descrise prin cinetică de pseudo-prim ordin, care acceptă o constantă a vitezei dependentă de concentrație.

▼M1

În scopul facilitării stabilirii planului experimental și interpretării rezultatelor, informațiile despre biodegrabilitatea la concentrații mari a substanței testate (obținute în urma testelor standard de triere), precum și cele privind abiotică, produșii de transformare și proprietățile fizico-chimice relevante trebuie să se cunoască înainte de test. Biodegradabilitatea finală poate fi stabilită ca urmare a folosirii substanțelor de testat marcate cu izotop ^{14}C și determinarea distribuției fazice a ^{14}C la sfârșitul testului. Dacă se folosește substanță de testat nemarcată, biodegradarea finală poate fi estimată doar dacă se testează o concentrație mai mare și se cunosc toți produșii principali de transformare.

1.2. DEFINIȚII

Biodegradare primară: Modificarea (transformarea) structurii unei substanțe chimice sub acțiunea unor microorganisme, având ca rezultat pierderea proprietăților chimice.

Biodegradare funcțională: Modificarea (transformarea) structurii unei substanțe chimice ca urmare a acțiunii unor microorganisme, având ca rezultat pierderea unei anumite proprietăți chimice.

Biodegradare aerobă finală: Descompunerea unei substanțe chimice în dioxid de carbon, apă și săruri minerale ale oricărui alt element prezent sub acțiunea unor microorganisme în prezența oxigenului (mineralizare) și obținerea de biomasă și produși noi de biosinteză microbiană organică.

Mineralizare: Descompunerea unei substanțe chimice sau materii organice în dioxid de carbon, apă și săruri minerale ale oricărui alt element prezent ca urmare a acțiunii unor microorganisme în prezența oxigenului.

Fază de latență: Perioada cuprinsă între începutul unui test și momentul în care se realizează adaptarea microorganismelor care produc degradarea, iar gradul de biodegradare al unei substanțe chimice sau materii organice a crescut la un nivel detectabil (de exemplu 10 % din biodegradarea teoretică maximă sau mai puțin, în funcție de precizia metodei de măsurare).

Nivel maxim de biodegradare: Gradul de biodegradare a unei substanțe chimice sau materii organice într-un test, înregistrat în procente, dincolo de care nu are loc biodegradare în timpul testului.

Substrat primar: Colecție de surse naturale de energie și carbon care asigură creșterea și menținerea biomasei microbiene.

Substrat secundar: Componenta unui substrat prezentă într-o concentrație atât de scăzută, încât, în urma degradării sale, microorganismele competente primesc doar cantități minime de carbon și energie comparativ cu carbonul și energia furnizate prin degradarea componentelor substratului principal (substraturi primare).

Constanta vitezei degradării: Constantă cinetică de prim ordin sau pseudo-prim ordin k (zi^{-1}), indicând viteza procesului de degradare. Pentru un experiment în serie, k se estimează din partea inițială a curbei degradării obținute după încheierea fazei de latență.

▼M1

Timp de înjumătățire, $t_{1/2}$ (zi): Termen folosit pentru caracterizarea vitezei unei reacții de prim ordin. Este intervalul de timp care corespunde unei scăderi a concentrației de 2 ori. Timpul de înjumătățire și constanta vitezei de degradare sunt corelate de ecuația $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Timp de înjumătățire a degradării, DT_{50} (zi): Termen utilizat pentru cuantificarea rezultatului testelor de biodegradare. Este intervalul de timp (inclusiv faza de latență) necesar pentru atingerea unei valori de 50 % a biodegradării.

Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ): Limita de detecție (LOD) este concentrația unei substanțe sub nivelul căreia identitatea unei substanțe nu mai poate fi deosebită de artefactele analitice. Limita de cuantificare (LOQ) este concentrația unei substanțe sub nivelul căreia concentrația nu poate fi determinată cu o precizie acceptabilă.

Carbon organic dizolvat (COD): Acea parte a carbonului organic dintr-un eșantion de apă care nu poate fi eliminată prin separarea fazelor specificate, cum ar fi centrifugarea la 40 000 ms^{-2} timp de 15 minute sau filtrarea prin membrană cu pori de diametru 0,2 μm-0,45 μm.

Activitatea organică totală a ^{14}C (TOA): Activitatea totală a ^{14}C asociată cu carbonul organic.

Activitatea ^{14}C organic dizolvat (DOA): Activitatea totală a ^{14}C asociată cu carbonul organic dizolvat.

Activitatea ^{14}C organic sub formă de particule (POA): Activitatea totală a ^{14}C asociată cu carbonul organic sub formă de particule.

1.3. APLICABILITATEA TESTULUI

Acest test de simulare este aplicabil substanțelor organice nevolatile sau ușor volatile testate la concentrații scăzute. Folosind recipiente în care intră aerul (de exemplu acoperite cu vată hidrofilă), substanțele cu o constantă a legii lui Henry mai mică de aproximativ 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (aprox. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) pot fi considerate practic nevolatile. Testarea substanțelor puțin volatile (cu constante ale legii lui Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ sau < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) poate avea loc fără pierderi din sistemul de testare dacă se folosesc recipiente închise cu volum tampon. CO_2 se va îndepărta cu respectarea măsurilor de siguranță adecvate, în caz contrar putând avea loc pierderi de substanță marcată cu ^{14}C. În astfel de situații, poate fi necesară capturarea CO_2 într-o coloană de absorbție conținând compuși alcalini sau folosirea unui sistem absorbant extern de CO_2 (determinare directă a $^{14}CO_2$; a se vedea apendicele 3). Pentru determinarea cineticii biodegradării, concentrațiile de substanță de testat trebuie să fie inferioare solubilității acesteia în apă. Trebuie remarcat totuși că valorile solubilității în apă din lucrările științifice pot fi considerabil mai mari decât solubilitatea substanței testate în ape naturale. Opțional, solubilitatea substanțelor de testat cu grad scăzut de solubilitate în apă poate fi stabilită prin folosirea apelor naturale testate.

Metoda poate fi folosită pentru simularea biodegradării în apă de suprafață care nu conține particule mari (test pelagic) sau în apă de suprafață cu turbiditate, de exemplu care poate exista în apropierea unei interfețe apă/sedimente (test pe sedimente în suspensie).

▼M1

1.4. PRINCIPIUL TESTULUI

Testul se efectuează în serii, prin incubarea substanței de testat exclusiv cu apă de suprafață (test pelagic) sau apă de suprafață combinată cu solide/sedimente în suspensie între 0,01-1 g/l greutate uscată (test pe sedimente suspendate) pentru simularea unui curs de apă cu solide în suspensie sau sedimente resuspendate. Concentrația solidelor/sedimentelor suspendate în intervalul inferior al acestui domeniu este reprezentativă pentru majoritatea apelor de suprafață. Recipientele de testare sunt incubate la întuneric, la temperatura mediului ambiant, în condiții aerobe, și sunt agitate. Pentru determinarea cineticii degradării se vor folosi cel puțin două concentrații diferite ale substanței testate. Concentrațiile trebuie să difere între ele cu un factor cuprins între 5-10, care trebuie să reprezinte intervalul așteptat de concentrații în mediul ambiant. Concentrația maximă a substanței testate nu trebuie să depășească 100 μg/l, dar sunt preferate concentrațiile de testare maxime inferioare 10 μg/l pentru ca biodegradarea să fie conformă cineticii de prim ordin. Concentrația minimă nu trebuie să depășească 10 μg/l, dar sunt preferate concentrațiile minime de 1-2 μg/l sau inferioare 1 μg/l. În mod normal, o analiză adecvată a unor concentrații atât de scăzute se poate realiza cu ajutorul substanțelor marcate ^{14}C disponibile în comerț. Ca urmare a limitărilor analitice, măsurarea concentrației substanței testate cu precizia necesară este de cele mai multe ori imposibilă dacă substanța testată se aplică la o concentrație ≤ 100 μg/l (a se vedea punctul 1.7.2 al doilea paragraf). Concentrațiile mai mari ale substanței testate (> 100 μg/l și, uneori, > 1 mg/l) pot fi folosite pentru identificarea și cuantificarea produșilor principali de transformare sau dacă nu există o metodă specifică de analiză cu o limită scăzută a detectării. Dacă se testează concentrații mari ale substanței testate, este posibil ca rezultatele să nu poată fi folosite pentru estimarea constantei degradării de prim ordin și a timpului de înjumătățire, deoarece degradarea ar putea să nu respecte cinetica de prim ordin.

Degradarea se urmărește la intervale de timp regulate prin măsurarea ^{14}C rezidual sau, dacă se folosește o analiză chimică specifică, prin măsurarea concentrației substanței testate. Marcarea cu ^{14}C a celei mai stabile părți a moleculei permite determinarea mineralizării totale, în timp ce marcarea cu ^{14}C a părții mai puțin stabile a moleculei, precum și folosirea analizei specifice permit doar evaluarea biodegradării primare. Cu toate acestea, porțiunea cea mai stabilă nu include în mod obligatoriu fracțiunea funcțională relevantă a moleculei (care poate fi corelată cu o proprietate specifică, cum ar fi toxicitatea, bioacumularea etc.). În acest caz, se recomandă folosirea în porțiunea funcțională a unei substanțe de testat marcate cu ^{14}C în scopul urmăririi eliminării acelei proprietăți.

1.5. INFORMAȚII REFERITOARE LA SUBSTANȚA DE TESTAT

În acest test pot fi folosite deopotrivă substanțe de testat marcate sau nemarcate radioactiv. Se recomandă tehnica de marcare cu ^{14}C, iar marcarea trebuie să aibă loc în porțiunea (porțiunile) cea (cele) mai stabilă (stabile) a (ale) moleculei (a se vedea și punctul 1.4). În cazul substanțelor care conțin mai mult de un inel aromatic, se preferă ca unul sau mai mulți atomi de carbon din fiecare inel să se marcheze cu ^{14}C. În plus, se preferă ca unul sau mai mulți atomi de carbon de pe ambele părți ale legăturilor ușor de scindat să se marcheze cu ^{14}C. Puritatea chimică și/sau radiochimică a substanței testate trebuie să fie > 95 %. În cazul substanțelor marcate radioactiv este preferată o activitate specifică de aproximativ 50 μCi/mg (1,85 MBq) sau mai mare, în scopul facilitării măsurării ^{14}C în testele realizate la concentrații inițiale scăzute. Vor fi disponibile următoarele informații despre substanța testată:

▼**M1**

— solubilitatea în apă [metoda de testare A.6];

— solubilitatea în solvent (solvenți) organic (organici) (substanțe folosite împreună cu solvent sau cu solubilitate scăzută în apă);

— constanta de disociere (pKa) dacă este posibil ca substanța să fie supusă unei protonări sau deprotonări [orientarea nr. 112 a OECD] (5);

— presiunea de vapori (metoda A.4) și constanta legii lui Henry;

— stabilitate chimică în apă și la întuneric (hidroliză) [metoda C.7].

Când substanțele cu solubilitate scăzută în apă se testează în apă de mare, este utilă cunoașterea constantei de desalifiere (sau „constanta Setschenow") K^s, definită prin expresia log (S/S') = K^s C_m, unde S și S' sunt solubilitatea substanței în apă dulce și, respectiv, în apă de mare, iar C_m este concentrația molară de sare.

Dacă testul se desfășoară ca „test pe sedimente în suspensie", următoarele informații vor fi disponibile:

— coeficientul de partiție n-octanol/apă [metoda A.8];

— coeficientul de adsorbție [metoda C.18].

Alte informații utile pot include:

— concentrația în mediu, dacă se cunoaște sau estimată;

— toxicitatea substanței testate asupra microorganismelor [metoda C.11];

— biodegradabilitatea imediată și/sau intrinsecă [metodele C.4 A-F, C.12, C.9, orientarea nr. 302 a OECD (5)];

— biodegradabilitatea aerobă sau anaerobă în sol și studii de transformare în sedimente/apă [metodele C.23, C.24].

1.6. SUBSTANȚĂ DE REFERINȚĂ

Se folosește ca substanță de referință o substanță în mod normal ușor degradabilă în condiții aerobe (de exemplu anilină sau benzoat de sodiu). Intervalul de timp preconizat pentru degradarea anilinei și benzoatului de sodiu este de obicei mai mic de două săptămâni. Scopul substanțelor de referință este de a asigura menținerea activității microbiene a apei de testare în anumite limite; de exemplu, se verifică dacă apa conține o populație microbiană activă.

▼M1

1.7. CRITERII DE CALITATE

1.7.1. **Recuperare**

Imediat după adăugarea substanței de testat, fiecare concentrație inițială de testare se verifică prin măsurarea activității ^{14}C sau prin analize chimice în cazul substanțelor nemarcate, în cel puțin eșantioane duble. Aceasta oferă informații privind aplicabilitatea și repetabilitatea metodei analitice, precum și omogenitatea distribuției substanței testate. În mod normal, activitatea ^{14}C sau concentrația substanței testate măsurate inițial se folosesc în analizele ulterioare ale datelor, nu în concentrația nominală, deoarece pierderile provocate de sorbție și erorile de dozare sunt astfel compensate. În cazul substanței testate marcate cu ^{14}C, nivelul de recuperare de la sfârșitul experimentului este dat de bilanțul maselor (a se vedea punctul 1.8.9.4 ultimul paragraf). În mod ideal, bilanțul maselor marcate radioactiv trebuie să fie cuprins între 90 % și 110 %, în timp ce precizia analitică trebuie să conducă la o recuperare inițială cuprinsă între 70 % și 110 % pentru substanțe de testat nemarcate. Aceste intervale se interpretează ca ținte și nu se folosesc sub formă de criterii pentru acceptabilitatea testului. Opțional, precizia analitică se poate determina pentru substanța testată la o concentrație mai mică decât cea inițială și pentru produșii de transformare.

1.7.2. **Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice**

Repetabilitatea metodei analitice (cu excepția randamentului extracției inițiale) în ceea ce privește cuantificarea substanței de testat și a produșilor de transformare se poate controla prin efectuarea de cinci analize duplicate ale extraselor individuale de apă de suprafață.

Limita de detecție (LOD) a metodei analitice pentru substanța de testat și produșii de transformare trebuie să fie, dacă este posibil, de cel puțin 1 % din cantitatea inițială folosită în sistemul de testare. Limita de cuantificare (LOQ) trebuie să fie egală sau mai mică de 10 % din concentrația aplicată. Analizele chimice ale multor substanțe organice și produșii lor de transformare impun frecvent ca substanța de testat să fie folosită la o concentrație relativ mare, de exemplu > 100 μg/l.

1.8. DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

1.8.1. **Aparatură**

Testul poate fi efectuat în recipiente conice sau cilindrice de capacitate corespunzătoare (de exemplu de 0,5 sau 1,0 l) acoperite cu dopuri de silicon sau cauciuc, sau în recipiente serologice închise ermetic (de exemplu cu membrană de cauciuc butilic). O altă opțiune de efectuare a testului constă în folosirea de recipiente multiple și recoltarea în întregime a conținutului acestora, cel puțin în duplicat, la fiecare interval de prelevare (a se vedea punctul 1.8.9.1 ultimul paragraf). În cazul substanțelor de testat nevolatile care nu sunt marcate radioactiv, dopurile sau capacele etanșe nu sunt necesare; sunt suficiente dopurile de vată care previn contaminarea din aer (a se vedea punctul 1.8.9.1 al doilea paragraf). Substanțele puțin volatile se testează într-un sistem de tip biometru, cu agitarea ușoară a suprafeței apei. În scopul prevenirii contaminării bacteriene, vasele pot fi sterilizate opțional prin încălzire sau autoclavare înainte de folosire. În plus, se folosesc următoarele echipamente standard de laborator:

— masă de agitare sau agitatoare magnetice pentru agitare continuă a recipientelor de testare;

▼**M1**

— centrifugă;

— pH-metru;

— turbidimetru pentru măsurarea turbidității nefelometrice;

— etuvă sau cuptor cu microunde pentru determinarea greutății uscate;

— dispozitiv de filtrare cu membrană;

— autoclavă sau etuvă pentru sterilizarea la căldură a vaselor din sticlă;

— instrumente de manipulare a substanțelor marcate cu ^{14}C;

— echipamente pentru cuantificarea activității ^{14}C în eșantioane de soluții de captare a CO_2 și, dacă este necesar, din eșantioane de sedimente;

— echipamente analitice pentru determinarea substanței testate (și de referință) dacă se folosește analiză chimică specifică (de exemplu cromatograf cu gaz, cromatograf cu lichid la înaltă presiune).

1.8.2. **Soluțiile mamă ale substanței testate**

Pentru pregătirea soluțiilor mamă ale substanțelor de testat și de referință se folosește apă deionizată (a se vedea punctul 1.8.7 primul paragraf). Apa deionizată nu trebuie să conțină substanțe toxice pentru microorganisme, iar carbonul organic dizolvat (COD) nu trebuie să depășească 1 mg/l (6).

1.8.3. **Colectarea și transportul apei de suprafață**

Locurile de prelevare pentru colectarea apei naturale se selectează în funcție de finalitatea testului în fiecare caz în parte. Pentru alegerea locurilor de prelevare trebuie avut în vedere istoricul eventualelor aporturi de natură agricolă, industrială sau menajeră. Dacă se cunoaște că un mediu acvatic a fost contaminat cu substanță de testat sau cu produși de natură analogă pe parcursul ultimilor 4 ani, acesta nu va fi folosit pentru prelevarea de apă, cu excepția cazului în care obiectivul expres al experimentatorului este cercetarea ratelor de degradare ale locurilor expuse anterior. pH-ul și temperatura apei se măsoară la locul de prelevare. În plus, adâncimea de prelevare și aspectul eșantionului de apă (de exemplu culoare și turbiditate) se înregistrează (a se vedea punctul 3). Concentrația de oxigen și/sau potențialul redox în apă și în stratul sedimentelor de suprafață se măsoară în scopul demonstrării condițiilor aerobe, cu excepția situației în care acestea sunt cunoscute ca urmare a observării aspectului și condițiilor anterioare de la locul de prelevare. Apa de suprafață se transportă într-un container care a fost curățat cu atenție. În timpul transportului, temperatura eșantionului nu trebuie să depășească semnificativ temperatura testului. Dacă durata transportului depășește 2-3 ore, se recomandă răcirea la 4 °C. Eșantionul de apă nu se congelează.

▼M1

1.8.4. **Stocarea și prepararea apei de suprafață**

Se preferă ca textul să înceapă în termen de o zi de la colectarea eșantionului. Perioada de stocare a apei, dacă este necesară, se reduce la minimum și nu trebuie să depășească în niciun caz mai mult de 4 săptămâni. Eșantionul de apă se păstrează la 4 °C, în condiții de ventilație, până la folosire. Înainte de folosire, particulele mari se elimină, de exemplu prin filtrare cu ajutorul unui filtru de nailon cu o dimensiune a porilor de aproximativ 100 μm sau cu un filtru de hârtie cu porozitate mare sau prin sedimentare.

1.8.5. **Prepararea apei tratate cu sedimente (opțional)**

Pentru testul cu sedimente în suspensie, se adaugă sedimente de suprafață în recipiente conținând apă naturală (filtrată pentru eliminarea particulelor mari, conform descrierii de la punctul 1.8.4) pentru obținerea unei suspensii; concentrația solidelor în suspensie trebuie să fie între 0,01 și 1 g/l. Sedimentele de suprafață trebuie să provină din același loc de unde a fost prelevat eșantionul de apă. În funcție de mediul acvatic, sedimentele de suprafață pot fi caracterizate printr-un conținut ridicat de carbon organic (2,5-7,5 %) și o textură fină sau printr-un conținut scăzut de carbon organic (0,5-2,5 %) și o textură rugoasă (3). Sedimentele de suprafață se prepară după cum urmează: se extrag câteva carote de sediment intact folosind un tub de plastic transparent, se elimină straturile aerobe superioare (de la suprafață la o adâncime de max. 5 mm) imediat după prelevare și se combină. Eșantionul de sediment rezultat se transportă într-un recipient cu un volum mare al tamponului de aer pentru a menține sedimentul în condiții aerobe (răcit la 4 °C dacă durata transportului depășește 2-3 ore). Eșantionul de sediment se suspendă în apa de testare la un raport de 1:10 și se păstrează la 4 °C, în condiții de ventilare, până la folosire. Perioada de stocare a apei, dacă este necesară, se reduce la minimum și nu trebuie să depășească în niciun caz 4 săptămâni.

1.8.6. **Procedura semicontinuă (opțional)**

Dacă înainte ca substanța de testat să poată fi măsurată se manifestă o perioadă de latență lungă, poate fi necesară o incubare prelungită (câteva luni). Dacă acest aspect este cunoscut ca urmare a testării anterioare a unei substanțe, testul poate fi inițiat prin folosirea unei proceduri semicontinue, care permite reînnoirea periodică a unei porțiuni din apa sau suspensia de testare (a se vedea apendicele 2). Alternativ, dacă nu a avut loc o degradare a substanței de testat pe o perioadă de aproximativ 60 de zile de testare prin procedura în serii, testul normal în serii poate fi modificat într-un test semicontinuu (a se vedea punctul 1.8.8.3 al doilea paragraf).

1.8.7. **Adăugarea substanței de testat (sau de referință)**

Pentru substanțele cu solubilitate mare în apă (> 1 mg/l) și volatilitate scăzută (constante ale legii lui Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ sau < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) se poate prepara o soluție mamă în apă deionizată (a se vedea punctul 1.8.2); în vasele de testare se adaugă volumul corespunzător de soluție mamă pentru obținerea concentrației dorite. Volumul oricărei soluții mamă adăugate se menține la minimul practic (< 10 % din volumul lichid final, dacă este posibil). O altă procedură constă în dizolvarea substanței de testat într-un volum mai mare de apă de testat, aceasta putând fi considerată o alternativă la folosirea de solvenți organici.

▼M1

Dacă nu se poate evita, soluțiile mamă ale substanțelor nevolatile cu solubilitate scăzută în apă se prepară prin folosirea unui solvent organic volatil, dar cantitatea de solvent adăugată în sistemul de testare nu trebuie să depășească 1 % v/v și nu trebuie să aibă efecte adverse asupra activității microbiene. Solventul nu trebuie să afecteze stabilitatea substanței testate în apă. Solventul se elimină până ajunge la o cantitate extrem de mică, astfel încât să nu contribuie la creșterea semnificativă a concentrației COD a apei sau a suspensiei de testat. Aceasta se verifică prin intermediul unei analize specifice substanței sau, dacă este posibil, prin analiză COD (6). Se vor lua măsuri pentru limitarea la strictul necesar a cantității de solvent transferate și pentru asigurarea dizolvării substanței testate în volumul final de apă de testat. Alte tehnici de introducere a substanței testate în vasele de testare sunt descrise la notele (7) și (8). Atunci când la aplicarea substanței de testat se folosește un solvent organic, probele martor ale solventului conținând apa de testat (fără adăugări) și apa de testat cu substanța de referință adăugată sunt tratate similar cu vasele de testare activă în care s-a adăugat substanță de testat în solvent purtător. Rolul probelor martor ale solventului este de a examina posibilele efecte adverse ale solventului asupra populației microbiene, acestea fiind indicate de degradarea substanței de referință.

1.8.8. **Condiții de testare**

1.8.8.1. *Temperatura de testare*

Incubarea are loc la întuneric (preferabil) sau în condiții de lumină difuză, la temperatură controlată (± 2 °C), care poate fi temperatura ambientală sau o temperatură standard cuprinsă între 20-25 °C. Temperatura ambientală poate fi temperatura reală a eșantionului în momentul prelevării sau o temperatură ambientală medie la locul de prelevare.

1.8.8.2. *Agitare*

Agitarea (scuturare sau agitare continuă) are rolul de a menține particulele și microorganismele în suspensie. Agitarea facilitează, de asemenea, transferul de oxigen din volumul tampon către lichid, în scopul menținerii condițiilor aerobe adecvate. Recipientele se așază pe o masă de agitare (cu o frecvență de aprox. 100 rpm) sau se folosește agitare magnetică. Agitarea trebuie să fie continuă. Cu toate acestea, scuturarea sau agitarea vor fi cât mai ușoare posibil, menținându-se în același timp o suspensie omogenă.

1.8.8.3. *Durata testului*

În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 60 de zile, cu excepția cazului în care se aplică procedura semicontinuă cu reînnoire periodică a suspensiei de testat (a se vedea punctul 1.8.6 și apendicele 2). Cu toate acestea, dacă substanța testată a început să se degradeze în primele 60 de zile, perioada de testare a seriei poate fi extinsă la cel mult 90 de zile. Degradarea se monitorizează prin determinarea activității ^{14}C rezidual sau a $^{14}CO_2$ degajat (a se vedea punctul 1.8.9.4) și/sau prin analiză chimică (punctul 1.8.9.5) la intervale de timp adecvate. Perioada de incubare trebuie să fie suficient de lungă pentru a permite evaluarea procesului de degradare. Preferabil, nivelul degradării trebuie să depășească 50 %; în cazul substanțelor lent degradabile, nivelul degradării trebuie să fie suficient (în mod normal, mai mare de 20 %) pentru a permite estimarea constantei vitezei cineticii de degradare.

▼M1

Se vor efectua măsurători periodice ale pH-ului și concentrației oxigenului în sistemul de testare, cu excepția cazurilor în care astfel de teste sunt inutile ca urmare a existenței unor date anterioare din teste similare cu eșantioane de apă și sedimente colectate din același loc. În unele condiții, metabolismul substraturilor primare la concentrații mult mai mari în apă sau sedimente poate provoca o degajare de CO_2 și o epuizare a oxigenului suficient de mari pentru a modifica în mod semnificativ condițiile experimentale din timpul testului.

1.8.9. **Procedură**

1.8.9.1. *Pregătirea recipientelor pentru testul pelagic*

Se transferă un volum corespunzător de apă de testat în recipientele de testare, până la aproximativ o treime din volumul recipientului, nu mai puțin de 100 ml. Dacă se folosesc recipiente multiple (care permit recoltarea conținutului din întregul recipient la fiecare punct de prelevare), volumul corespunzător al apei de testat va fi tot de 100 ml, deoarece volumele mici ale eșantioanelor pot influența lungimea fazei de latență. Substanța de testat se adaugă dintr-o soluție mamă conform descrierii de la punctele 1.8.2 și 1.8.7. Pentru determinarea cineticii degradării și calcularea constantei vitezei cineticii de degradare se vor folosi cel puțin două concentrații de substanță de testat, diferența dintre acestea fiind un factor cuprins între 5 și 10. Ambele concentrații selectate trebuie să fie mai mici de 100 μg/l și, preferabil, să se situeze în intervalul < 1-10 μg/l.

Recipientele se astupă cu dopuri sau capace impermeabile la aer și CO_2. În cazul substanțelor chimice de testat nevolatile care nu sunt marcate cu ^{14}C, sunt suficiente dopurile de vată care previn contaminarea din aer (a se vedea punctul 1.8.1), dacă produșii majori de degradare sunt cunoscuți ca nevolatili și se folosește determinarea indirect a CO_2 (a se vedea apendicele 3).

Recipientele se incubează la temperatura selectată (a se vedea punctul 1.8.8.1). Eșantioanele se retrag pentru analiză chimică sau măsurarea ^{14}C la începutul testului (înainte de începerea biodegradării; a se vedea punctul 1.7.1), apoi la intervale adecvate în cursul testului. Recoltarea se efectuează prin retragerea subeșantioanelor (de exemplu alicote de 5 ml) din fiecare duplicat sau prin recoltarea întregului conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare. Mineralizarea substanței de testat poate fi determinată în mod direct sau indirect (a se vedea apendicele 3). În mod obișnuit, în timpul fazei de degradare (după terminarea fazei de latență) sunt necesare minimum cinci puncte de prelevare pentru estimarea unei constante precise a vitezei, cu excepția cazurilor când se poate demonstra că trei puncte de prelevare sunt suficiente pentru substanțele cu degradare rapidă. Pentru substanțele care nu se degradează rapid se pot face mai multe măsurători în timpul fazei de degradare și, prin urmare, se vor folosi mai multe puncte experimentale pentru estimarea k. Deoarece viteza de biodegradare variază, nu poate fi indicat un program fix de recoltare; cu toate acestea, dacă degradarea este lentă, se recomandă ca recoltarea să aibă loc o dată pe săptămână. Dacă substanța testată este rapid degradabilă, recoltarea trebuie să se efectueze o dată pe zi în primele trei zile, apoi la fiecare două sau trei zile. În anumite situații, cum ar fi cele în care se lucrează cu substanțe rapid hidrolizabile, recoltarea poate fi necesară la intervale de o oră. Se recomandă efectuarea unui studiu preliminar înainte de test, în scopul stabilirii intervalelor de recoltare adecvate. Dacă eșantioanele trebuie să fie disponibile și pentru alte analize specifice, se recomandă recoltarea mai multor eșantioane și selectarea celor care urmează să fie analizate la sfârșitul experimentului prin intermediul unei strategii inverse, prin care ultimele eșantioane se analizează prima dată (a se vedea punctul 1.8.9.5 al doilea paragraf, pentru recomandări privind stabilitatea eșantioanelor în timpul stocării).

▼**M1**

1.8.9.2. *Numărul recipientelor și eșantioanelor*

Va fi disponibil un număr suficient de recipiente de testare pentru a avea:

— recipiente de testare: cel puțin două recipiente pentru fiecare concentrație a substanței de testat (preferabil, minimum 3) sau recipiente de testare multiple pentru fiecare concentrație, dacă se recoltează întregul conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare (reprezentate F_T);

— recipiente de testare pentru calculul bilanțului masic; cel puțin două recipiente pentru fiecare concentrație de testare (reprezentate F_M);

— probă martor, fără substanță de testat; cel puțin un recipient martor de testat conținând doar apa de testare (reprezentată F_B);

— etalon de referință; două recipiente cu substanță de referință (de exemplu anilină sau benzoat de sodiu, la 10 µg/l) (reprezentat F_C). Scopul etalonului de referință este de a confirma un minim de activitate microbiană. Dacă este util, se poate folosi o substanță de referință marcată radioactiv, folosită și în cazurile când degradarea substanței de testat este monitorizată prin analize chimice;

— etalon steril; unul sau două recipiente conținând apă de testare sterilizată necesară pentru examinarea posibilei degradări abiotice sau pentru altă procedură de eliminare prin mijloace nebiologice a substanței de testat (reprezentat F_S). Activitatea biologică poate fi oprită prin autoclavarea (121 °C; 20 min.) apei de testare sau prin adăugarea unei substanțe toxice [de exemplu azidă de sodiu (NaN_3), clorură de mercur ($HgCl_2$) la 100 mg/l sau formol la 100 mg/l] sau prin radiații gama. Dacă se folosește $HgCl_2$, acesta se va elimina conform procedurii pentru deșeuri toxice. Condițiile de sterilitate nu sunt ușor de obținut în cazul în care se adaugă apă cu sedimente în cantitate mare; în acest caz se recomandă autoclavarea repetată (de exemplu de trei ori). Trebuie avut în vedere că, prin autoclavare, caracteristicile de sorbție ale sedimentelor pot fi modificate;

— etaloane de solvent, conținând apă de testat și apă de testat cu substanță de referință; recipiente duble tratate cu aceeași cantitate de solvent și prin folosirea unei proceduri similare cu cea pentru aplicarea substanței de testat. Obiectivul este de a examina efectele adverse posibile ale solventului prin determinarea degradării substanței de referință.

În conceperea testului, experimentatorul trebuie să ia în considerare importanța relativă a creșterii duplicării experimentale comparativ cu creșterea numărului momentelor de recoltare. Numărul exact al recipientelor necesare va depinde de metoda folosită pentru măsurarea degradării (a se vedea punctul 1.8.9.1 al treilea paragraf, punctul 1.8.9.4 și apendicele 3).

▼M1

În fiecare moment de prelevare, din fiecare recipient de testare se retrag două subeșantioane (de exemplu alicote de 5 ml). Dacă se folosesc mai multe recipiente pentru a fi posibilă recoltarea întregului conținut al recipientelor, în fiecare moment de prelevare se sacrifică cel puțin două recipiente (a se vedea punctul 1.8.9.1 primul paragraf).

1.8.9.3. *Prepararea recipientelor pentru testul pe sedimente în suspensie [opțional]*

Se adaugă volumele necesare de apă și sedimente de testare în vasele de testare, dacă este necesar (a se vedea punctul 1.8.5). Procedura de pregătire a recipientelor pentru testul pe sedimente în suspensie este similară cu cea pentru testul pelagic (a se vedea punctele 1.8.9.1 și 1.8.9.2). Se folosesc, preferabil, flacoane serologice sau recipiente de o formă asemănătoare. Sticlele (închise) se așază orizontal pe un agitator. Recipientele deschise pentru substanțe nevolatile care nu sunt marcate cu ^{14}C se așază, evident, în poziție verticală; în astfel de situații se recomandă folosirea unui agitator magnetic și a unor tije magnetice căptușite cu sticlă. Dacă este necesar, sticlele se aerisesc pentru menținerea condițiilor aerobe adecvate.

1.8.9.4. *Determinări radiochimice*

$^{14}CO_2$ degajat se măsoară indirect sau direct (a se vedea apendicele 3). $^{14}CO_2$ se determină indirect prin diferența între activitatea inițială a ^{14}C în apa sau în suspensia de testat și activitatea reziduală totală în momentul prelevării, măsurată după acidifierea eșantionului la pH 2-3 și eliminarea CO_2. Astfel, carbonul anorganic este îndepărtat, iar activitatea reziduală măsurată provine din materialul organic. Determinarea indirectă a $^{14}CO_2$ nu se folosește dacă în timpul transformării substanței testate se formează produși majori volatili de transformare (a se vedea apendicele 3). Dacă este posibil, degajarea $^{14}CO_2$ se măsoară direct (a se vedea apendicele 3) în fiecare moment de prelevare în cel puțin un recipient de testare; această procedură permite verificarea deopotrivă a bilanțului masic și a procesului de biodegradare, dar este limitată la teste efectuate cu recipiente închise.

Dacă $^{14}CO_2$ degajat se măsoară direct în timpul testului, la începutul acestuia vor fi pregătite mai multe recipiente în acest scop. Dacă în timpul transformării substanței de testat se formează produși majori volatili de transformare, se recomandă determinarea directă a $^{14}CO_2$. În fiecare punct de măsurare, recipientele de testare suplimentare se acidifiază la pH 2-3, iar $^{14}CO_2$ se colectează într-un absorbant intern sau extern (a se vedea apendicele 3).

Opțional, concentrațiile substanței de testat marcate cu ^{14}C și ale produșilor majori de transformare se pot determina prin folosirea radiocromatografiei (cromatografie în strat subțire, RAD-TLC) sau HPLC cu detectare radiochimică.

Opțional, se poate determina distribuția fazică a radioactivității rămase (a se vedea apendicele 1), a substanței de testat reziduale și a produșilor de transformare.

▼M1

La sfârșitul testului, bilanțul masic se determină prin măsurare directă a $^{14}CO_2$ folosind recipiente de testare separate, din care nu se recoltează eșantioane în cursul testului (a se vedea apendicele 3).

1.8.9.5. *Analiză chimică specifică*

Dacă există o metodă analitică specifică sensibilă, biodegradarea primară se poate evalua prin măsurarea concentrației reziduale totale a substanței testate, și nu prin folosirea tehnicilor de marcare radioactivă. Dacă se folosește o substanță de testat marcată radioactiv (pentru măsurarea mineralizării totale), se pot realiza în paralel analize chimice specifice care să ofere informații suplimentare utile și să contribuie la verificarea procedurii. Analizele chimice specifice mai pot fi folosite pentru măsurarea produșilor de transformare formați în timpul degradării substanței de testare, acestea fiind recomandate pentru substanțe care se mineralizează cu timpi de înjumătățire care depășesc 60 de zile. La fiecare prelevare se măsoară și se înregistrează concentrația substanței de testat și produșii de transformare (ca procent și concentrație de substanță aplicată). Ca regulă generală, se identifică toți produșii de transformare pentru care se detectează ≥ 10 % din concentrația aplicată, indiferent de momentul prelevării, cu excepția cazurilor în care există justificări rezonabile. Se identifică, de asemenea, produșii de transformare a căror concentrație crește constant pe durata studiului, chiar și în cazurile în care concentrațiile acestora nu depășesc limitele menționate mai sus, deoarece este posibil ca acesta să fie un indiciu asupra persistenței. Vor fi avute în vedere analize ale produșilor de transformare din etaloanele sterile dacă se consideră că sunt posibile transformări abiotice rapide ale substanței de testat (hidroliză). Nevoia de cuantificare și identificare a produșilor de transformare va fi examinată de la caz la caz, justificările fiind indicate în raport. Tehnicile de extracție cu solvent organic se aplică în conformitate cu îndrumările prezentate în procedura analitică respectivă.

Dacă analiza se desfășoară în 24 de ore (preferabil), toate eșantioanele se păstrează închise ermetic, la temperaturi între 2-4 °C. Pentru perioade mai lungi de stocare, eșantioanele se congelează sub – 18 °C sau se conservă prin metode chimice. Nu se recomandă metoda de păstrare prin acidifiere, deoarece eșantioanele acidifiate pot fi instabile. Dacă eșantioanele nu sunt analizate în termen de 24 de ore și se păstrează pentru o perioadă mai lungă, se va efectua un studiu privind stabilitatea la stocare, pentru a se determina dacă substanțele chimice de interes sunt stabile la temperaturi mai mici de – 18 °C sau în stare de conservare. Dacă metoda analitică presupune extracția cu solvent sau în fază solidă (SPE), extracția se efectuează imediat după recoltare sau după stocarea eșantionului la rece timp de maximum 24 de ore.

În funcție de sensibilitatea metodei analitice, pot fi necesare volume mai mari ale eșantionului decât cele indicate la punctul 1.8.1. Testul poate fi desfășurat cu ușurință cu volume de testare de un litru în recipiente cu un volum de 2-3 litri, ceea ce face posibilă recoltarea de eșantioane de aprox. 100 ml.

▼M1

2. **DATE ŞI RAPORT**

2.1. PRELUCRAREA REZULTATELOR

2.1.1. **Reprezentarea grafică a datelor**

Timpii de recoltare se rotunjesc la un număr întreg de ore (cu excepția cazului în care substanța se degradează substanțial într-o perioadă de minute sau ore), dar nu la un număr întreg de zile. Se reprezintă estimările activității reziduale ale substanței de testat (pentru substanțe marcate cu ^{14}C) sau concentrația reziduală (pentru substanțele nemarcate) în funcție de timp atât într-un grafic linear, cât și în unul semilogaritmic (a se vedea figurile 1a, 1b). Dacă degradarea a avut loc, se compară rezultatele recipientelor F_T cu cele ale recipientelor F_S. Dacă mediile rezultatelor pentru recipientele cu substanță de testat (F_T) și pentru recipientele sterile (F_S) deviază cu mai puțin de 10 %, se presupune că degradarea observată este predominant abiotică. Dacă degradarea din recipientele (F_S) este mai scăzută, cifrele pot fi folosite pentru a le corecta pe cele obținute cu recipientele F_T (prin scădere) în scopul estimării nivelului biodegradării. Când se efectuează analize opționale pentru produșii principali de transformare, formarea și declinul lor se reprezintă alături de graficul declinului substanței testate.

Durata t_L a fazei de latență se estimează din curba degradării (grafic semilogaritmic) prin extrapolarea porțiunii sale lineare la degradare zero sau, alternativ, prin determinarea timpului pentru o degradare de aproximativ 10 % (figurile 1a și 1b). Constanta vitezei de prim ordin k se estimează pe baza graficului semilogaritmic, iar eroarea sa standard se stabilește prin regresia lineară a ln (activitatea reziduală a ^{14}C sau concentrația substanței testate) în funcție de timp. În ceea ce privește măsurătorile ^{14}C, în special, se folosesc doar date care aparțin porțiunii lineare inițiale a curbei după terminarea fazei de latență și se preferă selectarea de date mai puține, dar mai reprezentative, în locul selectării unui număr mare de date incerte. În acest caz, incertitudinea se referă la erori intrinseci legate de folosirea directă recomandată a activităților ^{14}C rezidual măsurat (a se vedea mai jos). Dacă degradarea urmează un model bifazic, uneori poate fi utilă calcularea a două constante diferite ale vitezei. În acest scop, sunt definite două faze diferite ale curbei degradării. Calcularea constantei vitezei de degradare k și a timpului de înjumătățire $t_{½} = ln2/k$ se realizează pentru fiecare dintre recipientele duplicate, dacă se extrag subeșantioane din același recipient, sau prin folosirea valorilor medii, când se recoltează întregul conținut al recipientelor la fiecare moment de prelevare (a se vedea punctul 1.8.9.2 ultimul paragraf). Când se folosește prima dintre procedurile menționate, constanta vitezei și timpul de înjumătățire se raportează pentru fiecare dintre recipientele duplicate ca valoare medie cu o eroare standard. Dacă au fost folosite concentrații mari ale substanțelor de testat, curba degradării poate devia considerabil de la o linie dreaptă (grafic semilogaritmic), iar cinetica de prim ordin poate să nu fie validă. Prin urmare, definirea timpului de înjumătățire nu are sens. Cu toate acestea, timpul de înjumătățire a degradării DT_{50} (perioada necesară pentru atingerea unei degradări de 50 %) poate fi estimat ca urmare a aplicării cineticii de pseudo-prim ordin pentru un interval limitat de date. Trebuie reținut totuși că perioada degradării dincolo de intervalul selectat de date nu poate fi previzionată folosind DT_{50}, acesta fiind doar un indicator al unui set de date oferite. Oferta de instrumente analitice pentru facilitarea calculelor statistice și a interpolării este bogată, folosirea acestui tip de software fiind recomandată.

▼M1

Dacă se realizează analize chimice specifice, constantele vitezei și timpii de înjumătățire pentru degradarea primară se estimează conform metodei de mai sus pentru mineralizarea totală. Dacă degradarea primară este procesul limitant, uneori pot fi folosite puncte experimentale din întregul proces de degradare. Aceasta se întâmplă deoarece, spre deosebire de măsurătorile activității ^{14}C, măsurătorile sunt directe.

Dacă se folosesc substanțe marcate cu ^{14}C, cel puțin la sfârșitul testului se va exprima un bilanț masic în procente din concentrația aplicată inițial.

2.1.2. **Activitate reziduală**

Când porțiunea marcată cu ^{14}C a unei substanțe organice se biodegradează, porțiunea principală a ^{14}C se transformă în $^{14}CO_2$, în timp ce o altă porțiune este folosită pentru creșterea biomasei și/sau sinteza metaboliților extracelulari. Prin urmare, biodegradabilitatea „finală” completă a unei substanțe nu are ca rezultat transformarea în proporție de 100 % a carbonului său în $^{14}CO_2$. ^{14}C inclus în produse formate prin biosinteză este degajat lent ulterior ca $^{14}CO_2$ ca urmare a „mineralizării secundare”. Din aceste cauze, graficele activității ^{14}C organic rezidual (măsurat după îndepărtarea CO_2) sau a $^{14}CO_2$ produs în funcție de timp arată o „coadă” după ce degradarea s-a finalizat. Acest lucru complică interpretarea cinetică a datelor și, în acest scop, doar partea inițială a curbei (după terminarea fazei de latență și înainte de atingerea nivelului de 50 % degradare) se folosește în mod normal pentru estimarea unei constante a vitezei de degradare. Dacă substanța testată este degradată, activitatea ^{14}C organic rezidual este întotdeauna mai mare decât activitatea ^{14}C asociată cu substanța testată rămasă intactă. Dacă substanța testată se degradează ca urmare a unei reacții de prim ordin, iar o fracțiune constantă α se mineralizează în CO_2, panta inițială a curbei de dispariție a ^{14}C (^{14}C total organic în funcție de timp) va fi α înmulțit cu panta curbei corespunzătoare concentrației substanței testate (sau, pentru precizie, partea substanței testate marcate cu ^{14}C). Dacă se folosesc măsurătorile activității ^{14}C organice totale necorectate, constanta calculată a vitezei degradării va fi conservativă. Proceduri de estimare a concentrațiilor substanței testate din activitățile radiochimice măsurate bazate pe diferite ipoteze de simplificare au fost descrise în literatura de specialitate (2)(9)(10)(11). Astfel de proceduri sunt cel mai ușor de aplicat pentru substanțele cu degradare rapidă.

2.2. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Dacă se constată că valoarea k este independentă de concentrația adăugată (în cazul în care k obținut în urma calculelor este aproximativ egal la concentrații diferite ale substanței de testat), se presupune reprezentativitatea constantei vitezei de prim ordin pentru condițiile de testare folosite, cum ar fi substanța de testat, eșantionul de apă și temperatura de testare. Măsura în care rezultatele pot fi generalizate sau extrapolate către alte sisteme se evaluează de către experți. Dacă se folosește o concentrație mare a substanței de testat și, prin urmare, degradarea nu urmează cinetica de prim ordin, datele nu pot fi folosite pentru estimarea directă a unei constante a vitezei de prim ordin sau a timpului de înjumătățire corespunzător. Cu toate acestea, datele obținute în urma unui test folosind o concentrație mare a substanței de testat pot fi în continuare utile pentru estimarea gradului de mineralizare totală și/sau detectarea sau cuantificarea produșilor de transformare.

▼M1

Dacă se cunosc vitezele unor procese de pierdere altele decât biodegradarea (de exemplu hidroliză sau volatilizare), acestea pot fi scăzute din viteza netă de pierdere observată în timpul testului, pentru a se obține o estimare aproximativă a vitezei de biodegradare. Datele pentru hidroliză pot fi obținute, printre altele, din etalonul steril sau în urma testării paralele cu o concentrație mai mare a substanței testate.

Determinarea directă și indirectă a $^{14}CO_2$ (punctul 1.8.9.4 și apendicele 3) pot fi folosite doar pentru măsurarea gradului de mineralizare a substanței testate în CO_2. Analiza concentrației substanței de testat marcate cu ^{14}C și a formării produșilor majori de transformare se poate realiza cu ajutorul metodelor radiocromatografiei (RAD-TLC) sau HPLC (punctul 1.8.9.4 al treilea paragraf). Pentru a se permite estimarea directă a timpului de înjumătățire, nu trebuie să fie prezenți produși majori de transformare (definiți ca ≥ 10 % din cantitatea aplicată de substanță de testat). Dacă sunt prezenți produși majori de transformare care corespund definiției de mai sus, este necesară o evaluare detaliată a datelor. Aceasta poate include testarea și/sau identificarea repetată a produșilor de transformare (a se vedea punctul 1.8.9.5 primul paragraf), cu excepția situației în care evoluția produșilor de transformare poate fi evaluată cu un grad rezonabil de precizie pe baza experienței (de exemplu informații despre calea de degradare). Deoarece proporția carbonului din substanța de testat convertit în CO_2 variază (depinzând în mare proporție de concentrația substanței de testat și a altor substraturi disponibile, condițiile de testare și populația microbiană), acest test nu permite o estimare clară a biodegradării finale, asemeni celei din testul de epuizare COD; totuși, rezultatele sunt similare cu cele obținute ca urmare a folosirii unui test respirometric. Astfel, gradul de mineralizare va fi mai mic sau egal cu nivelul minim al biodegradării finale. Pentru a se obține o imagine completă a biodegradării finale (mineralizarea și încorporarea în biomasă), la sfârșitul testului se efectuează analiza distribuției fazice a ^{14}C (a se vedea apendicele 1).^{14}C din amestecul de particule va consta în ^{14}C încorporat în biomasa bacteriană și ^{14}C absorbit în particule organice.

2.3. VALIDITATEA TESTULUI

Dacă substanța de referință nu se degradează în intervalul de timp prevăzut (pentru anilină și benzoat de sodiu, în mod normal, mai puțin de două săptămâni), validitatea testului poate fi pusă sub semnul întrebării și trebuie verificată sau, alternativ, testul se repetă cu un nou eșantion de apă. Într-un test interlaboratoare ISO al metodei, la care au participat șapte laboratoare din Europa, constantele adaptate ale vitezei de degradare pentru anilină s-au situat în intervalul 0,3-1,7 zi^{-1}, cu o medie de 0,8 zi^{-1} la 20 °C și o eroare standard de ± 0,4 zi^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 zile). Timpii de latență tipici s-au situat între 1 și 7 zile. Pentru apele examinate a fost raportată o biomasă bacteriană corespunzând la 10^3-10^4 unități formatoare de colonii (UFC) per ml. Vitezele de degradare în apele central-europene bogate în nutrienți au fost mai mari decât în apele oligotrofe nordice, ceea ce se poate datora stării trofice diferite sau expunerii anterioare la substanțe chimice.

Recuperarea totală (bilanțul masic) la sfârșitul experimentului trebuie să fie cuprinsă între 90 % și 110 % pentru substanțele marcate radioactiv, în timp ce recuperarea inițială la începutul experimentului trebuie să fie cuprinsă între 70 % și 110 % pentru substanțele nemarcate. Cu toate acestea, intervalele indicate se interpretează doar ca ținte și nu se folosesc drept criterii de acceptare a testului.

▼M1

3. **RAPORT DE TESTARE**

Tipul studiului (test pelagic sau pe sedimente în suspensie) se indică clar în raportul de testare, care va mai conține cel puțin următoarele informații:

Substanță(e) de testat și de referință:

— denumirile uzuale, numele substanțelor chimice (se recomandă numele IUPAC și/sau CAS), numerele CAS, formulele structurale (indicând poziția ^{14}C dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanței de testat și de referință (a se vedea punctele 1.5 și 1.6);

— numele substanțelor chimice, numerele CAS, formulele structurale (indicând poziția ^{14}C dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante ale substanțelor folosite ca standarde de identificare sau cuantificare a produșilor de transformare;

— puritatea (impuritățile) substanțelor de testat și de referință;

— puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

Apa de suprafață:

Se furnizează cel puțin următoarele informații despre eșantionul de apă:

— locația și descrierea locului de recoltare, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminărilor;

— data și locul colectării eșantionului;

— nutrienți (N total, amoniu, azotit, azotat, P total, ortofosfat dizolvat);

— adâncimea de colectare;

— aspectul eșantionului (de exemplu culoare și turbiditate);

— DOC și COT;

— CBO;

— temperatura și pH-ul la momentul colectării;

— prezența oxigenului sau potențialul redox (obligatoriu doar dacă nu sunt evidente condiții aerobe);

— salinitatea sau conductivitatea (în cazul apei de mare sau al apei salmastre);

— solide în suspensie (în cazul unui eșantion tulbure);

— posibil, alte informații relevante despre locația de recoltare în momentul colectării (de exemplu informații actuale sau istorice despre viteza de curgere a râurilor sau a curentelor marine, deversările importante apropiate și tipul de deversare, condițiile meteorologice anterioare momentului recoltării);

și opțional:

— biomasa microbiană (de exemplu aprecierea directă a oranjului de acridină sau a unităților formatoare de colonii);

▼M1

— carbonul anorganic;

— concentrația de clorofilă-a ca indicator specific al biomasei algelor.

În plus, dacă se efectuează testul pe sedimente suspendate, se furnizează următoarele informații despre sedimente:

— adâncimea de colectare a sedimentelor;

— aspectul sedimentului (colorat, noroios, nămolos sau nisipos);

— textura (de exemplu procentul de nisip grunjos, nisip fin, nămol și argilă);

— greutatea uscată în g/l a solidelor în suspensie, concentrația COT sau pierderea de greutate la calcinare ca metodă de măsurare a conținutului materiei organice;

— pH;

— prezența oxigenului sau potențialul redox (obligatoriu doar dacă nu sunt evidente condiții aerobe).

Condițiile de testare:

— intervalul între colectare și folosire în testul de laborator, păstrarea eșantionului și pretratarea eșantionului, datele efectuării studiilor;

— cantitatea de substanță de testat aplicată, concentrația de testare și substanța de referință;

— metoda de aplicare a substanței de testat, inclusiv folosirea de solvenți;

— volumul de apă de suprafață și de sedimente folosite (dacă sunt folosite) și volumul recoltat pentru analiză la fiecare moment;

— descrierea sistemului de testare folosit.

Dacă nu se păstrează întunericul, informații despre condițiile de „iluminare difuză”;

— informații despre metoda (metodele) folosite pentru stabilirea etaloanelor sterile (de exemplu temperatură, perioadă și număr de autoclavări);

— temperatura de incubare;

— informații despre tehnicile analitice și metoda (metodele) folosite pentru măsurătorile radiochimice, precum și pentru verificarea bilanțului masic și măsurarea distribuției fazice (dacă este cazul);

— numărul de duplicate.

Rezultate:

— procentele de recuperare (a se vedea punctul 1.7.1);

— repetabilitatea și sensibilitatea metodelor analitice folosite, inclusiv limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ) (a se vedea punctul 1.7.2);

▼M1

— toate datele măsurate (inclusiv punctele de recoltare) și valorile calculate în formă tabelară, precum și curbele de degradare; pentru fiecare concentrație de testare și pentru fiecare recipient duplicat se raportează coeficientul de corelație lineară pentru panta logaritmică, faza de latență estimată și o constantă a vitezei de prim ordin sau pseudo-prim ordin (dacă este posibil) și timpul de înjumătățire corespunzător al degradării (sau perioada de înjumătățire, t_{50});

— valorile relevante se raportează ca medii ale rezultatelor observate la duplicatele individuale, cum ar fi durata fazei de latență, constanta vitezei degradării și timpul de înjumătățire a degradării (sau t_{50});

— sistemul este clasificat ca neadaptat sau adaptat pe baza aspectului curbei de degradare și a posibilei influențe a concentrației de testare;

— rezultatele verificării bilanțului masic final și rezultatele măsurării distribuției fazice (dacă există);

— fracțiunea ^{14}C mineralizat și, dacă se folosesc analize specifice, nivelul final de degradare primară;

— identificarea, concentrația molară și procentajul de produși aplicați și produși majori de transformare (a se vedea punctul 1.8.9.5 primul paragraf), dacă este cazul;

— propunerea unei căi de transformare, dacă este cazul;

— discutarea rezultatelor.

4. **REFERINȚE BIBLIOGRAFICE**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Metoda de testare C.23. Transformarea aerobă și anaerobă în sol.

4. Metoda de testare C.24. Transformarea aerobă și anaerobă în sedimente acvatice.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Apendicele 1

Distribuția fazică a ^{14}C

În scopul verificării procedurii, măsurătorile de rutină ale activității ^{14}C organice totale (TOA) reziduale se completează cu măsurările bilanțului masic care presupun o determinare directă a $^{14}CO_2$ degajat după captarea într-un absorbant (a se vedea apendicele 3). Formarea de $^{14}CO_2$ este, în sine, o probă directă a biodegradării în contrast cu degradarea abiotică sau alte mecanisme de pierdere, cum ar fi volatilizarea sau absorbția. Informații utile suplimentare ce caracterizează biodegradabilitatea pot fi obținute în urma măsurării distribuției TOA între starea dizolvată (activitatea ^{14}C organic dizolvat, DOA) și starea sub formă de particule (activitatea ^{14}C sub formă de particule, POA) după separarea particulelor prin filtrarea prin membrană sau centrifugare. POA constă în substanță de testat absorbită în biomasa microbiană și în alte particule pe lângă carbonul substanței de testat care a fost folosit pentru sinteza noului material celular și, prin urmare, încorporat în fracțiunea biomasei sub formă de particule. Formarea de material organic ^{14}C dizolvat poate fi estimată ca DOA la sfârșitul biodegradării (platou al curbei degradării în funcție de timp).

Distribuția fazică a ^{14}C rezidual din eșantioanele selectate se estimează prin filtrarea acestora printr-o membrană filtrantă de 0,22 μm sau 0,45 μm dintr-un material care nu adsoarbe cantități semnificative ale substanței de testat (de exemplu filtrele din policarbonat). Dacă cantitatea de substanță de testat absorbită în filtru este prea mare pentru a fi neglijată (a se verifica înainte de experiment), în locul filtrării poate fi folosită metoda centrifugării la viteză mare (2 000 g; 10 min).

Filtratul sau centrifugatul se tratează conform metodei pentru eșantioane nefiltrate din apendicele 3. Membranele filtrante se dizolvă în fluid de scintilație corespunzător și se face numărarea în mod obișnuit, atenuarea fiind corectată de obicei doar prin folosirea metodei raportului față de standardul extern sau prin oxidarea eșantionului. Dacă s-a folosit metoda centrifugării, granulele formate din fracțiunea sub formă de particule se suspendă din nou în 1-2 ml de apă distilată și se transferă într-un flacon de scintilație. Se spală ulterior de două ori cu câte 1 ml apă distilată, care se transferă apoi în flacon. Dacă este necesar, suspensia poate fi introdusă într-un gel pentru numărarea scintilației lichide.

▼M1

Apendicele 2

Procedura semicontinuă

Pentru degradarea substanțelor rezistente poate fi necesară o incubație prelungită, de până la câteva luni. În mod normal, durata testului nu trebuie să depășească 60 de zile, cu excepția cazului când caracteristicile eșantionului original de apă se mențin prin reînnoirea suspensiei de testat. Cu toate acestea, dacă substanța testată a început să se degradeze în primele 60 de zile, perioada de testare poate fi extinsă la cel mult 90 de zile fără reînnoirea suspensiei de testat.

În timpul incubației pentru perioade lungi, diversitatea populației microbiene poate să fie redusă ca urmare a diverse mecanisme de pierdere și a posibilei epuizări a nutrienților necesari și a substraturilor primare de carbon din eșantionul de apă. Se recomandă, prin urmare, efectuarea unui test semicontinuu în scopul determinării corecte a vitezei de degradare a substanțelor lent degradabile. Testul se inițiază prin folosirea procedurii semicontinue dacă, pe baza experienței anterioare, se crede că va fi necesară o perioadă de incubație de trei luni pentru obținerea unui procent de degradare a substanței de 20 %. Alternativ, dacă nu a avut loc degradarea substanței testate în aproximativ 60 de zile de testare prin metoda în serii, acesta poate fi modificat într-un test semicontinuu. Dacă a fost înregistrată o degradare substanțială (de exemplu > 20 %), procedura semicontinuă poate fi întreruptă, iar testul continuat ca experiment în serii.

În testul semicontinuu, la fiecare două săptămâni, aproximativ 1/3 din volumul suspensiei de testat se înlocuiește cu apă proaspăt colectată, substanța testată adăugându-se la concentrația inițială. În mod similar, dacă s-a efectuat testul opțional pe sedimente în suspensie, sedimentul se adaugă la apa de înlocuire până la atingerea concentrației inițiale (între 0,01 și 1 g/l). În ceea ce privește desfășurarea testului cu solide de sediment în suspensie, este important ca sistemul să fie menținut în suspensie completă și în timpul reînnoirii apei, iar timpul de reținere să fie identic pentru solide și apă, în caz contrar putându-se pierde similaritatea dorită cu un sistem omogen apos fără faze fixe. Din aceste motive, când se folosește procedura semicontinuă, se preferă o concentrație inițială a sedimentelor în suspensie aflată în intervalul inferior al domeniului specificat.

Adăugarea recomandată de substanță de testat presupune că concentrația inițială a substanței de testat nu este depășită de reînnoirea parțială a suspensiei de testat și, prin urmare, se evită adaptarea (care are loc frecvent la o concentrație mare a substanței de testat). Deoarece procedura include atât reinocularea, cât și compensarea nutrienților și substraturilor primare epuizate, diversitatea microbiană originală este refăcută, iar durata testului poate fi extinsă, în principiu, la infinit. Este important de observat că, atunci când se folosește procedura semicontinuă, concentrația reziduală a substanței de testat trebuie să fie corectată în funcție de cantitățile substanței de testat adăugate și îndepărtate la fiecare procedură de reînnoire. Concentrația de substanță de testat totală și dizolvată poate fi folosită alternativ pentru compușii slab absorbanți. Absorbția este nesemnificativă (< 5 %) în condițiile specificate (0,1-1 g solide/l) pentru substanțe cu log K_{ow} < 3 (valabil pentru compuși neutri și lipofilici). Acest aspect este ilustrat prin următorul exemplu de calcul. 0,1 g/l de solide corespund aproximativ la 10 mg de carbon per litru (fracțiunea de carbon, f_C = 0,01). Presupunând că:

Log K_{ow} (din substanța de testat) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Coeficient de partiție, $K_d = f_C \times K_{oc}$

atunci fracțiunea dizolvată din concentrația totală C-apă (C_w)/C-total (C_t) este:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Apendicele 3

Determinarea $^{14}CO_2$

Determinarea indirectă a $^{14}CO_2$

În mod normal, pentru măsurătorile de rutină, metoda indirectă este cea mai rapidă și precisă metodă dacă substanța de testat este nevolatilă și nu se transformă în produși de transformare volatili. Se transferă eșantioane nefiltrate (de 5 ml) în flacoane de scintilație. Un nivel inițial adecvat al activității în eșantioane este de 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), iar activitatea inițială minimă este de aproximativ 1 000 dpm. CO_2 se elimină după acidifiere la pH 2-3 cu 1-2 picături de H_3PO_4 sau HCl concentrat. Eliminarea CO_2 poate fi efectuată prin barbotare cu aer timp de aproximativ ½-1 oră. Alternativ, flacoanele pot fi agitate cu putere timp de 1-2 ore (de exemplu pe un agitator pentru microplăci) sau lent, peste noapte. Eficiența procedurii de eliminare a CO_2 se verifică (prin prelungirea perioadei de aerisire sau agitare). Se adaugă apoi un lichid de scintilație adecvat pentru numărarea eșantioanelor apoase, eșantionul se omogenizează pe un mixer turbionar, iar radioactivitatea se determină prin cuantificarea scintilației lichidului, scăzând activitatea de fond determinată în probele martor de testat (F_B). Cu excepția cazului când apa de testat este foarte colorată sau conține o concentrație mare de particule, eșantioanele vor manifesta o atenuare uniformă, aceasta fiind suficientă pentru efectuarea corecțiilor atenuării folosind un standard extern. Dacă apa de testat este foarte colorată, corectarea atenuării se poate efectua cu ajutorul adăugării unui standard intern. Dacă concentrația particulelor este mare, nu este posibilă obținerea unei soluții sau gel omogen, variația atenuării între eșantioane fiind mare în caz contrar. În acest caz, poate fi folosită metoda de numărare pentru mâlurile de testare, descrisă mai jos. Dacă testul se desfășoară ca test pe sedimente în suspensie, măsurarea $^{14}CO_2$ poate avea loc indirect, prin extragerea unui eșantion omogen de 10 ml apă/suspensie de testare și separarea fazelor prin centrifugare la o viteză corespunzătoare (de exemplu la 40 000 m/s^2 timp de 15 minute). Faza apoasă se tratează apoi conform procedurii descrise mai sus. Activitatea ^{14}C în faza de particule (POA) se determină prin resuspendarea sedimentului într-un volum mic de apă distilată, transferarea în flacoane de scintilație și adăugarea de lichid de scintilație pentru formarea unui gel (în acest scop, sunt disponibile lichide speciale de scintilație). În funcție de natura particulelor (de exemplu conținutul lor de material organic), eșantionul poate fi digerat în timpul nopții cu ajutorul unui dizolvant de țesuturi și apoi omogenizat pe un mixer turbionar înainte de adăugarea lichidului de scintilație. Alternativ, POA poate fi determinat prin combustie în exces de oxigen, folosind un oxidant al eșantionului. Pentru cuantificare, se includ întotdeauna standarde interne, corectarea atenuării putând fi efectuată, dacă este necesar, prin adăugarea unui standard intern pentru fiecare eșantion individual.

Determinarea directă a $^{14}CO_2$

Dacă $^{14}CO_2$ degajat este măsurat direct, aceasta se realizează prin folosirea unui număr mai mare de recipiente la începutul testului, recoltarea conținutului recipientelor de testare la fiecare punct de măsurare prin acidifierea recipientelor de testare la pH de 2-3 și captarea $^{14}CO_2$ într-un absorbant intern (introdus în fiecare recipient de testare la începutul testului) sau extern. Ca mediu absorbant se pot folosi hidroxizi alcalini (de exemplu soluție 1 N de NaOH sau o granulă de NaOH), etanolamină sau absorbanți pe bază de etanolamină disponibili în comerț. Pentru măsurarea directă a $^{14}CO_2$, recipientele se astupă (de exemplu cu o membrană din cauciuc butilic).

▼**M1**

Figura 1a

Exemplu de reprezentare aritmetică a datelor (activitatea reziduală în funcție de timp)

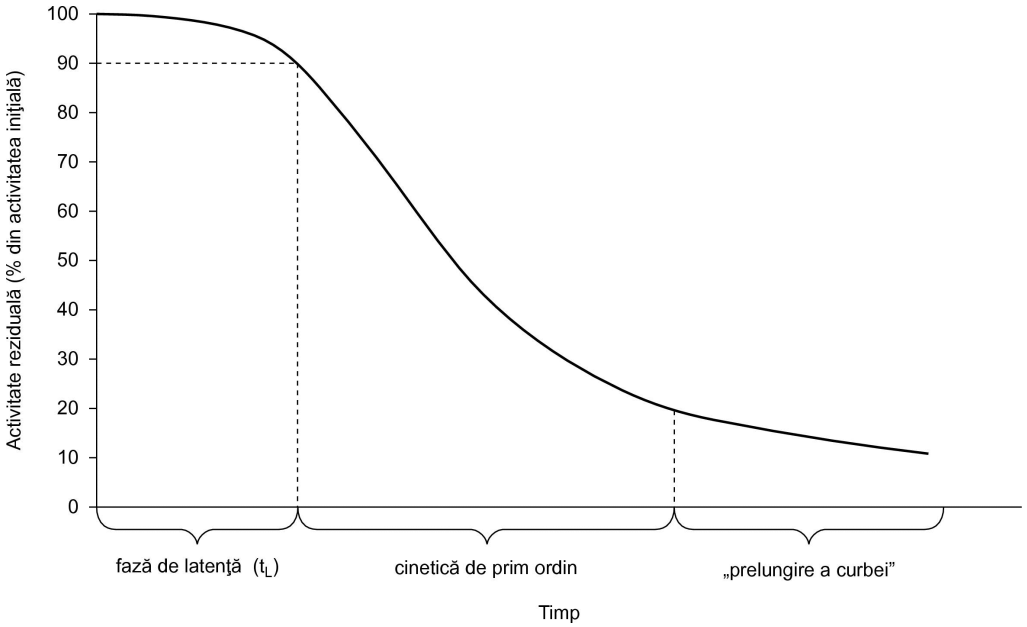
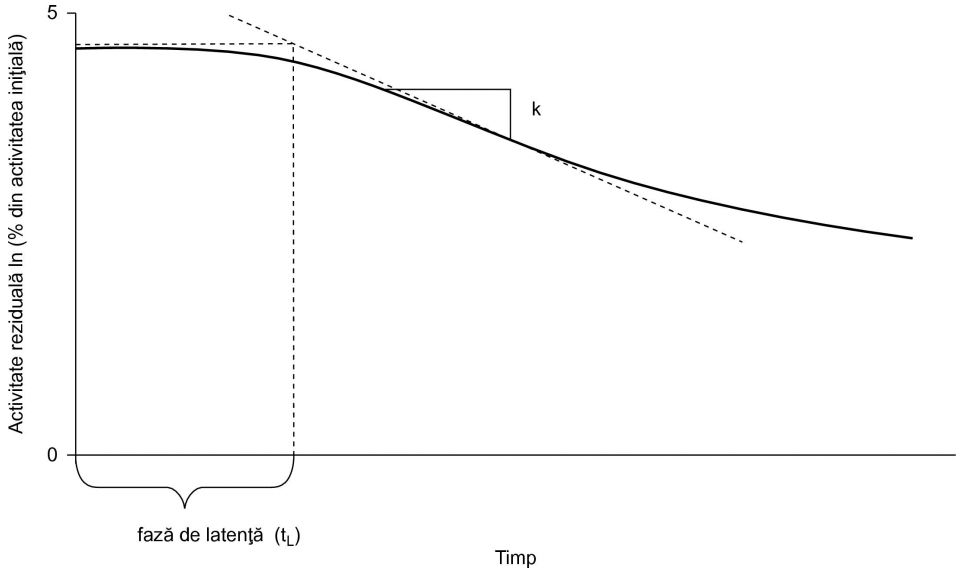


Figura 1b

Exemplu de reprezentare semilogaritmică a datelor (ln al activității reziduale în funcție de timp)



▼M6

C.26. TEST DE INHIBARE A CREȘTERII LA SPECIILE DE *LEMNA*

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 221 (2006). Aceasta a fost concepută pentru a evalua toxicitatea substanțelor chimice asupra plantelor acvatice de apă dulce din genul *Lemna* (lintiță). Se bazează pe metodele (1)(2)(3)(4)(5)(6) existente, dar include modificări ale acestor metode pentru a reflecta cercetările și consultările recente asupra unei serii de aspecte-cheie. Prezenta metodă de testare a fost validată printr-un ring test internațional (7).

2. Prezenta metodă de testare descrie testarea toxicității prin folosirea *Lemna gibba* și *Lemna minor*, care au fost ambele studiate pe larg și fac obiectul standardelor menționate mai sus. Taxonomia speciilor de *Lemna* este dificilă, fiind complicată de existența unei game largi de fenotipuri. Deși în cazul *Lemna* se poate manifesta o variabilitate genetică în ceea ce privește răspunsul față de substanțele toxice, în prezent nu există date suficiente despre această sursă de variabilitate pentru a se recomanda folosirea unei anumite clone pentru această metodă de testare. Trebuie reținut că testul nu se desfășoară în condiții axenice, dar sunt luate măsuri de reducere la minimum a contaminării cu alte organisme în timpul procedurii de testare.

3. Sunt descrise detaliile privind testarea cu reînnoire (semistatică și în regim dinamic) și fără reînnoire (statică) a soluției de testare. În funcție de obiectivele testului și de cerințele de reglementare, se recomandă aplicarea metodei semistatice și a metodei dinamice, de exemplu pentru substanțe chimice care se pierd cu rapiditate din soluție ca urmare a volatilizării, fotodegradării, precipitării sau biodegradării. Alte orientări sunt disponibile în referința (8).

4. Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

5. Culturile de plante cu creștere exponențială din genul *Lemna* se lasă să crească în monoculturi, cu diferite concentrații ale substanței chimice de testare, timp de șapte zile. Obiectivul testului este de a cuantifica efectele substanței chimice asupra creșterii vegetative în această perioadă, pe baza evaluărilor variabilelor de măsurare selectate. Numărul de fronde este variabila de măsurare principală. Se mai măsoară cel puțin încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă), deoarece unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare considerabil mai mult decât numărul de fronde. Pentru cuantificarea efectelor substanței chimice, creșterea în soluțiile de testare se compară cu cea a probelor de control, fiind determinată concentrația care provoacă o inhibare specificată de x % a creșterii (de exemplu 50 %) și exprimată ca EC_x (de exemplu EC_{50}).

6. Punctul final de testare este inhibarea creșterii, exprimată ca creștere logaritmică a variabilei de măsurare (viteza medie specifică de creștere) în timpul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a vitezei de creștere specificată de x % (de exemplu 50 %) se determină din vitezele medii specifice de creștere înregistrate pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca E_rC_x (de exemplu E_rC_{50}).

7. O variabilă de răspuns suplimentară folosită în prezenta metodă de testare este randamentul, care poate fi necesar pentru îndeplinirea unor cerințe de reglementare specifice din unele țări. Acesta se definește ca variabilele de măsurare la sfârșitul perioadei de expunere minus variabilele de măsurare la începutul perioadei de expunere. Concentrația care provoacă o inhibare a randamentului specificată de x % (de exemplu 50 %) se calculează din randamentul înregistrat pentru o serie de soluții de testare și este exprimată ca E_yC_x (de exemplu E_yC_{50}).

▼M6

8. În plus, concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

9. Este necesară o metodă analitică cu sensibilitate specifică pentru cuantificarea substanței chimice în mediul de testare.

10. Informațiile referitoare la substanța chimică de testare, care pot fi utile pentru stabilirea condițiilor de testare, includ formula structurală, puritatea, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a, K_{ow}, presiunea de vapori și biodegradabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea de vapori pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt probabile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în perioada de testare. Aceasta va indica dacă este necesară adoptarea anumitor măsuri pentru limitarea unor astfel de pierderi. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței chimice de testare sunt incerte, se recomandă ca acestea să fie evaluate în condițiile testului, cum ar fi mediul de cultură, temperatura sau condițiile de iluminare din test.

11. Când controlarea pH-ului mediului de testare are o importanță specială, de exemplu în cursul testării unor metale sau substanțe chimice instabile din punct de vedere hidrolitic, se recomandă adăugarea unui tampon în mediul de cultură (a se vedea punctul 21). Orientări suplimentare privind testarea substanțelor chimice cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (8).

VALIDITATEA TESTULUI

12. Pentru ca testul să fie valabil, perioada de dublare a numărului de fronde în proba de control trebuie să fie mai mică de 2,5 zile (60 de ore), corespunzând unei creșteri de aproximativ șapte ori într-o perioadă de șapte zile și unei viteze medii specifice de creștere de 0,275 zi^{-1}. Folosind mediul și condițiile de testare descrise în prezenta metodă de testare, acest criteriu poate fi îndeplinit prin folosirea unui test static (5). Se consideră că acest criteriu poate fi îndeplinit și în condiții de testare semistatică și dinamică. Calculul perioadei de dublare este prezentat la punctul 49.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

13. Substanța (substanțele) chimică (chimice) de referință, cum ar fi 3,5-diclorfenol, folosită (folosite) în ring testul internațional (7), poate (pot) fi testată (testate) ca mijloc de verificare a procedurii de testare. Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară mai puțin frecvent, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

14. Toate echipamentele care intră în contact cu mediile de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material chimic inert. Recipientele de sticlă folosite pentru cultură și testare trebuie să fie sterile și curățate de contaminanții chimici care se pot infiltra în mediul de testare. Vasele de testare trebuie să fie suficient de largi pentru ca frondele din diferitele colonii aflate în vasele de control să crească fără a se suprapune la sfârșitul testului. Nu este important dacă rădăcinile ating baza vaselor de testare, dar se recomandă o adâncime minimă de 20 mm și un volum minim de 100 ml în fiecare vas de testare. Tipul de vase de testare nu influențează desfășurarea testului atât timp cât se respectă aceste cerințe. Pot fi folosite pahare de laborator, vase de cristalizare sau plăci Petri din sticlă de dimensiuni corespunzătoare. Vasele de testare trebuie să fie acoperite

▼M6

pentru a se reduce la minimum evaporarea și contaminarea accidentală, permițând în același timp trecerea aerului. Vasele de testare corespunzătoare, în special capacele, trebuie să prevină formarea umbrei sau modificarea caracteristicilor spectrale ale luminii.

15. Culturile și vasele de testare nu se păstrează în același loc. Această condiție poate fi îndeplinită prin folosirea unor încăperi, incubatoare sau camere de creștere care reproduc condițiile de mediu. Iluminarea și temperatura trebuie să fie controlabile și menținute la un nivel constant (a se vedea punctele 35-36).

Organismul de testare

16. Organismul folosit pentru acest test este *Lemna gibba* sau *Lemna minor*. Scurte descrieri ale speciilor de lintiță care au fost folosite pentru testarea toxicității sunt prezentate în apendicele 2. Plantele pot fi obținute dintr-o colecție de culturi, de la un alt laborator sau de pe teren. Dacă sunt colectate de pe teren, plantele se mențin în cultură într-un mediu identic cu cel folosit pentru testare timp de cel puțin opt săptămâni înainte de utilizare. Terenurile de pe care s-au colectat culturile inițiale trebuie să fie lipsite de surse evidente de contaminare. Dacă au fost obținute de la un alt laborator sau dintr-o colecție de culturi, se vor menține în condiții similare timp de cel puțin trei săptămâni. Sursa plantelor, a speciilor și a clonei (dacă se cunoaște) folosite pentru testare se raportează întotdeauna.

17. Se vor folosi monoculturi care sunt vizibil necontaminate cu alte organisme, cum ar fi alge sau protozoare. Plantele sănătoase de *L. minor* vor consta în colonii cuprinzând între două și cinci fronde, în timp ce coloniile sănătoase de *L. gibba* pot conține până la șapte fronde.

18. Calitatea și uniformitatea plantelor folosite pentru testare vor avea o influență semnificativă asupra rezultatului testului și, prin urmare, se vor selecta cu atenție. Se vor folosi plante tinere, cu creștere rapidă, fără leziuni sau decolorări vizibile (cloroză). Culturile de bună calitate sunt indicate de numărul mare de colonii cuprinzând cel puțin două fronde. Un număr mare de fronde unice indică stres ambiental, cum ar fi o cantitate redusă de nutrienți, iar plantele din astfel de culturi nu se folosesc pentru testare.

Cultivarea

19. În scopul reducerii frecvenței de întreținere a culturii (de exemplu în situațiile în care nu sunt prevăzute teste cu *Lemna* pentru o anumită perioadă), culturile pot fi menținute în condiții de iluminare și temperatură scăzută (4-10 °C). Detalii privind culturile sunt prezentate în apendicele 3. Semnele vizibile de contaminare cu alge sau alte organisme pot necesita sterilizarea la suprafață a unui subeșantion de fronde de *Lemna*, urmată de transferul către un mediu proaspăt (a se vedea apendicele 3). În această situație, restul culturii contaminate se elimină.

20. Cu cel puțin șapte zile înainte de testare, se transferă un număr suficient de colonii în condiții aseptice într-un mediu steril proaspăt și se cultivă timp de 7-10 zile în condițiile de testare.

Mediul de testare

21. Pentru *Lemna minor* și *Lemna gibba* se recomandă medii diferite, conform descrierii de mai jos. Se va examina cu atenție includerea unui tampon de pH în mediul de testare [MOPS (acid 4-morfolinpropansulfonic, nr. CAS: 1132-61-2) în mediul *L. minor* și de $NaHCO_3$ în mediul *L. gibba*] când se suspectează că va reacționa cu substanța chimică de testare și va influența exprimarea toxicității acesteia. Mediul Steinberg (9) este de asemenea acceptabil dacă se îndeplinesc criteriile de validitate.

▼M6

22. Pentru cultura și testarea cu *L. minor* se recomandă o modificare a mediului de cultură a *Lemna* prevăzut de standardul suedez (SIS). Compoziția acestui mediu este prezentată în apendicele 4.

23. Mediul de cultură 20X-AAP, descris în apendicele 4, este recomandat pentru cultivarea și testarea cu *L. gibba*.

24. Mediul Steinberg descris în apendicele 4 este, de asemenea, adecvat pentru *L. minor*, dar poate fi folosit și pentru *L. gibba* dacă se îndeplinesc criteriile de validitate.

Soluții de testare

25. Soluțiile de testare se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc ale substanțelor chimice de testat se prepară în general prin dizolvarea substanței chimice în mediul de cultură.

26. Concentrația cea mai mare testată a substanței chimice de testare nu trebuie să depășească de preferință limita de solubilitate în apă a substanței chimice în condițiile de testare. Cu toate acestea, trebuie remarcat că speciile de *Lemna* plutesc la suprafață și pot fi expuse la substanțe chimice care se acumulează la interfața apă-aer (de exemplu substanțe chimice cu solubilitate scăzută în apă, hidrofobe sau tensioactive). În astfel de circumstanțe, expunerea va rezulta de la alte materiale decât cele din soluție, iar concentrațiile de testare pot depăși nivelul de solubilitate în apă, în funcție de caracteristicile substanței chimice de testare. În cazul substanțelor chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrate sau dispersia substanței chimice folosind un solvent sau agent de dispersie organic, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță chimică de testare în mediul de testare și a favoriza dispersia și dizolvarea sa. Se vor depune toate eforturile pentru evitarea folosirii unor astfel de materiale. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, printre solvenții obișnuiți care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l se numără acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la minimum ($\leq$ 100 µl/l), iar toate tratamentele și probele de control trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau agent de dispersie. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prezentate în referința (8).

Grupurile de testare și de control

27. Cunoașterea prealabilă a toxicității substanței chimice de testare față de *Lemna*, de exemplu în urma unui test de stabilire a intervalului, va permite alegerea concentrațiilor potrivite de testare. În testul final de stabilire a toxicității trebuie să existe în mod normal cel puțin cinci concentrații de testare dispuse în serie geometrică. Se preferă ca factorul de separare între concentrațiile de testare să nu depășească 3,2, dar se poate folosi o valoare mai mare în cazul în care curba concentrație-răspuns este plată. Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Pentru fiecare concentrație de testare se folosesc cel puțin trei probe duplicat.

28. La stabilirea intervalului de concentrații de testare (pentru testul de stabilire a intervalului și/sau testul final de stabilire a toxicității), trebuie să se rețină următoarele:

— pentru determinarea unei EC_x, concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea EC_x în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează EC_{50}, concentrația cea mai mare testată trebuie să fie mai mare decât valoarea EC_{50}. Dacă valoarea EC_{50} se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă;

— dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC, concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută, astfel încât creșterea să nu fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare, astfel încât creșterea să fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. Dacă

▼M6

nu este cazul, testul se va repeta folosind un interval diferit de concentrații (cu excepția cazului în care concentrația cea mai mare se află la limita solubilității sau la concentrația-limită maximă cerută, de exemplu 100 mg/l).

29. Fiecare test trebuie să includă probe de control constând în mediu nutritiv, număr de fronde și colonii, condiții de mediu și proceduri identice celor din vasele de testare, dar fără substanța chimică de testare. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie suplimentar, se va include o tratare suplimentară a probei de control cu acest solvent/agent de dispersie, prezent în aceeași concentrație cu cea din vasele cu substanța chimică de testare. Numărul vaselor de control duplicate (și vasele cu solvenți, dacă este cazul) trebuie să fie cel puțin egal cu numărul de vase folosite pentru fiecare concentrație de testare; în mod ideal acest număr va fi de două ori mai mare.

30. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, testul poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație. Cu toate acestea, numărul de probe duplicat de control trebuie să fie de cel puțin trei.

Expunere

31. Coloniile constând în 2-4 fronde vizibile se transferă din cultura de inocul și se distribuie aleatoriu în vasele de testare în condiții aseptice. Fiecare vas de testare va conține un total de 9-12 fronde. Numărul de fronde și colonii va fi același în fiecare vas de testare. Experiența dobândită în urma aplicării acestei metode și a ring testului a indicat că folosirea a trei probe duplicat per tratament, fiecare probă duplicat conținând inițial 9-12 fronde, este suficientă pentru a detecta diferențe de creștere de aproximativ 4-7 % inhibare calculată în funcție de viteza de creștere (10-15 % calculată în funcție de randament) între tratamente (7).

32. Vasele de testare vor fi poziționate aleatoriu în incubator pentru a se minimiza influența diferențelor spațiale de intensitate a luminii sau de temperatură. Este nevoie, de asemenea, de o dispunere fixă sau aleatorie a vaselor (sau o repoziționare mai frecventă) atunci când se fac observații.

33. Dacă un test preliminar de stabilitate arată că nu poate fi menținută concentrația substanței chimice de testat (concentrația măsurată scade sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe durata perioadei de testare (7 zile), se recomandă un test semistatic. În acest caz, coloniile se expun unor soluții proaspăt preparate de testare și de control de cel puțin două ori în timpul testului (de exemplu ziua 3 și ziua 5). Frecvența expunerii la un mediu proaspăt va depinde de stabilitatea substanței chimice de testare; pentru menținerea concentrațiilor cât mai aproape de nivelul constant în cazul substanțelor chimice foarte instabile sau volatile, poate fi necesară o frecvență mai mare. În unele situații poate fi necesară o procedură dinamică (8)(10).

34. Scenariul de expunere prin aplicare foliară (pulverizare) nu este inclus în prezenta metodă de testare. Pentru aceasta, a se vedea referința (11).

Condiții de incubare

35. Se va utiliza o lumină fluorescentă albă, caldă sau rece, continuă pentru a asigura o intensitate luminoasă cuprinsă în intervalul 85-135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$ atunci când este măsurată în radiație activă fotosintetică (400-700 nm) în puncte aflate la distanțe egale de sursa de lumină cu distanțele la care se află frondele de *Lemna* (echivalent cu 6 500-10 000 lucși). Diferențele față de intensitatea luminoasă selectată în zona de testare nu trebuie să depășească ± 15 %. Metoda de detectare și măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va influența valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumina din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de

▼M6

măsurare) și senzorii „cosinusf” (care răspund la lumina din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.

36. Temperatura din vasele de testare trebuie să fie de 24 ± 2 °C. pH-ul mediului de control nu trebuie să aibă o creștere mai mare de 1,5 unități în timpul testului. O deviație de peste 1,5 unități nu va invalida totuși testul dacă se poate demonstra întrunirea criteriilor de validitate. Se va acorda o atenție sporită devierii pH-ului în cazuri speciale, cum ar fi în timpul testării de substanțe chimice sau metale instabile. Pentru orientări suplimentare, a se vedea referința (8).

Durata

37. Testul se încheie după 7 zile de la transferul plantelor în vasele de testare.

Măsurători și determinări analitice

38. Numărul de fronde din vasele de testare se determină și se consemnează la începutul testului, acordându-se atenție înregistrării frondelor proeminente și distincte. Numărul de fronde cu aspect normal sau anormal se stabilește la începutul testului, cel puțin o dată la fiecare trei zile în timpul perioadei de expunere (adică cel puțin de două ori în timpul perioadei de 7 zile), precum și la încheierea testului. Se înregistrează modificările în dezvoltarea plantei, cum ar fi dimensiunea frondei, aspectul, indicațiile de necroză, cloroză sau gibozitate, separarea coloniilor sau pierderea de flotabilitate, precum și cele privind lungimea și aspectul rădăcinii. Se înregistrează, de asemenea, caracteristici semnificative ale mediului de testare (de exemplu prezența de material nedizolvat, creșterea de alge în vasul de testare).

39. Pe lângă determinările numărului de fronde în timpul testului, se evaluează și efectele substanței chimice de testare asupra uneia (sau mai multora) dintre următoarele variabile de măsurare:

(i) suprafața totală a frondelor;

(ii) greutatea uscată;

(iii) greutatea în stare proaspătă.

40. Suprafața totală a frondelor are avantajul de a putea fi determinată pentru fiecare vas de testare și de control la începutul, în timpul și la sfârșitul testului. Greutatea uscată sau în stare proaspătă se determină la începutul testului, pe baza unui eșantion al culturii de inocul reprezentativ pentru substanța folosită la începutul testului și la sfârșitul testului, pe baza materialului din fiecare vas de testare și de control. Dacă suprafața frondelor nu se măsoară, se preferă greutatea uscată în locul greutății în stare proaspătă.

41. Suprafața totală a frondelor, greutatea uscată și greutatea în stare proaspătă se determină după cum urmează:

(i) *Suprafața totală a frondelor*: suprafața totală a frondelor din toate coloniile poate fi determinată prin analiza imaginilor. Se capturează o imagine a vasului de testare și a plantelor cu ajutorul unei camere video (de exemplu, prin așezarea vasului pe o cutie iluminată), iar imaginea rezultată se prelucrează digital. Suprafața totală a frondelor dintr-un vas de testare se poate determina apoi prin calibrare cu forme plane de arie cunoscută. Trebuie acordată atenție excluderii interferențelor provocate de marginea vasului de testare. O metodă alternativă mai complicată constă în fotocopierea vasului de testare și a plantelor, decuparea siluetei rezultate a coloniilor și determinarea suprafeței lor folosind un analizor al suprafeței frunzelor sau hârtie milimetrică. Alte tehnici (de exemplu raportul dintre greutatea hârtiei corespunzătoare suprafeței siluetei coloniilor și greutatea hârtiei corespunzătoare suprafeței unei unități) pot fi, de asemenea, utile.

▼**M6**

(ii) *Greutatea uscată*: se colectează toate coloniile din vasele de testare și se clătesc cu apă distilată sau deionizată. Se înlătură excesul de apă și se usucă la 60 °C, până se atinge o greutate constantă. Se includ toate fragmentele de rădăcină. Greutatea uscată se exprimă cu o precizie de cel puțin 0,1 mg.

(iii) *Greutatea în stare proaspătă*: se transferă toate coloniile în tuburi de polistiren (sau alt material inert) precântărite, cu fund rotunjit care prezintă mici orificii (1 mm). Tuburile se centrifughează apoi la 3 000 rpm la temperatura camerei, timp de 10 minute. Tuburile, care conțin acum coloniile uscate, se recântăresc, iar greutatea în stare proaspătă se calculează prin scăderea greutății tubului gol.

Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice

42. Dacă se folosește un test static, pH-ul fiecărui tratament se măsoară la începutul și la sfârșitul testului. Dacă se folosește un test semistatic, pH-ul se măsoară în fiecare lot de soluție de testare „proaspătă” înainte de fiecare reînnoire, precum și în soluțiile „uzate” corespunzătoare.

43. Intensitatea luminoasă se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte aflate la distanțe de sursa de lumină identice cu cele ale frondelor de *Lemna*. Măsurătorile se fac cel puțin o dată în timpul testului. Temperatura mediului dintr-un vas înlocuitor menținut în condiții identice în încăperea, incubatorul sau camera de creștere se măsoară cel puțin o dată pe zi.

44. Concentrațiile substanței chimice de testat se determină la intervale corespunzătoare în timpul testului. În testele statice, cerința minimă este de a determina concentrațiile la începutul și la sfârșitul testului.

45. Pentru testele semistatice în care nu se estimează menținerea concentrației substanței chimice de testare în limita a ± 20 % din cea nominală, este necesară analizarea tuturor soluțiilor de testare proaspăt preparate și aceleași soluții la fiecare reînnoire (a se vedea punctul 33). Cu toate acestea, pentru testele în care concentrația inițială măsurată a substanței chimice de testare nu se situează în limita a ± 20 % din cea nominală, dar se pot aduce dovezi suficiente care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (adică în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinările chimice se vor efectua doar la concentrațiile de testare cele mai mari și cele mai scăzute. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare înainte de reînnoire trebuie efectuată doar la un vas duplicat la fiecare concentrație de testare (sau la conținutul vaselor combinate în funcție de proba duplicat).

46. Dacă se folosește un test în regim dinamic, se recomandă un regim de recoltare a eșantioanelor similar cu cel descris pentru testele semistatice, inclusiv analiza la începutul, mijlocul și sfârșitul testului, dar măsurarea soluțiilor „uzate” nu este adecvată în acest caz. La aceste tip de test, trebuie verificat zilnic debitul diluantului și al substanței chimice de testare sau al soluției stoc a substanței chimice de testare.

47. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a ± 20 % din cea nominală sau cea măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau cea măsurată inițial nu se află în limita a ± 20 %, este necesar ca rezultatele să se exprime în funcție de media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau de modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare (8).

▼M6

Test la valori-limită

48. În unele condiții, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanța chimică de testare nu are efecte toxice la concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita solubilității sale în mediul de testare (oricare dintre ele este mai scăzută), se poate realiza un test la valori-limită, care presupune compararea răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analizarea concentrației de expunere. Unui test la valori-limită i se aplică toate condițiile de testare și criteriile de validitate descrise anterior, cu excepția faptului că numărul de probe duplicat supuse tratamentului trebuie să fie dublu. Creșterea în grupul de control și în cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic de comparare a mediilor, cum ar fi un test-t (Student).

DATE ȘI RAPORT

Timp de duplicare

49. Pentru determinarea timpului de duplicare *(T_d)* a numărului de fronde și asigurarea respectării de către studiu a acestui criteriu de validitate (punctul 12), se utilizează următoarea formulă cu datele obținute de la vasele de control:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

unde μ este viteza medie specifică de creștere determinată conform descrierii de la punctele 54-55.

Variabile de răspuns

50. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testat asupra creșterii vegetative a *Lemna*. Prezenta metodă de testare descrie două variabile de răspuns, deoarece diferitele jurisdicții au preferințe și cerințe de reglementare diferite. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile în toate jurisdicțiile, efectele se evaluează folosind ambele variabile de răspuns (a) și (b) descrise mai jos.

(a) *Viteza medie specifică de creștere*: această variabilă de răspuns se calculează pe baza modificărilor logaritmilor numerelor de fronde și, în plus, pe baza modificărilor logaritmilor unui alt parametru de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) în funcție de timp (exprimat în zile) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Este numită uneori viteză relativă de creștere (12).

(b) *Randamentul*: această variabilă de răspuns se calculează pe baza modificărilor numărului de fronde și, în plus, pe baza modificărilor unui alt parametru de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului, până la finalul testului.

51. Trebuie remarcat că valorile de toxicitate calculate prin folosirea acestor două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență trebuie să fie recunoscută când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în general mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) în cazul în care condițiile de testare din prezenta metodă de testare sunt respectate, ca urmare a bazei matematice a abordărilor respective. Aceasta nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic. Conceptul de viteză medie specifică de creștere se bazează pe modelul general al creșterii exponențiale a lintiței în culturi nelimitate, în care toxicitatea se estimează pe baza efectelor asupra vitezei de creștere, fără a fi dependentă de nivelul absolut al vitezei specifice de creștere a probei de control, de panta curbei concentrație-răspuns sau de durata testului. Prin contrast, rezultatele bazate pe variabila de răspuns privind randamentul depind de toate aceste alte variabile. E_yC_x depinde de viteza specifică de creștere a speciilor de lintiță folosite pentru fiecare test și

▼M6

de viteza maximă specifică de creștere, care poate varia între specii și chiar între clone diferite. Această variabilă de răspuns nu se folosește pentru compararea sensibilității la substanțe toxice între speciile de lintiță și chiar clone diferite. În timp ce folosirea vitezei medii specifice de creștere în scopul estimării toxicității este preferată din punct de vedere științific, estimările de toxicitate bazate pe randament sunt, de asemenea, incluse în prezenta metodă de testare pentru a satisface cerințele de reglementare actuale din unele jurisdicții.

52. Estimările toxicității trebuie să se bazeze pe numărul de fronde și pe o variabilă de măsurare suplimentară (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă), deoarece unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare în proporție considerabil mai mare decât o poate face numărul de fronde. Acest efect nu va putea fi detectat exclusiv în urma calculării numărului de fronde.

53. Numărul de fronde, precum și orice altă variabilă de măsurare înregistrată, cum ar fi suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă, sunt introduse într-un tabel împreună cu concentrațiile substanței chimice de testare cu ocazia fiecărei măsurări. Analiza ulterioară a datelor, de exemplu pentru estimarea LOEC, NOEC sau a EC_x trebuie să se bazeze pe valorile probelor duplicat individuale, și nu pe mediile calculate pentru fiecare grup supus tratamentului.

Viteza medie specifică de creștere

54. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a variabilelor de creștere – numărul de fronde și încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) – pe baza formulei de mai jos pentru fiecare probă duplicat a probelor de control și a probelor supuse tratamentului:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

unde:

— μ_{i-j}: viteza medie specifică de creștere de la momentul i la momentul j

— N_i: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul i

— N_j: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

— t: perioada de timp cuprinsă între momentele i și j

Pentru fiecare grup supus tratamentului și pentru fiecare grup de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările variației.

55. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimările variației. În plus, viteza de creștere pe secțiuni se evaluează în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se produc în timpul perioadei de expunere (de exemplu prin verificarea curbelor de creștere transformate logaritmic). Diferențe substanțiale între viteza de creștere pe secțiuni și viteza medie de creștere indică o deviere de la creșterea exponențială constantă și impun verificarea atentă a curbelor de creștere. În acest caz, o abordare conservativă constă în compararea vitezelor specifice de creștere ale culturilor tratate în timpul perioadei de timp de inhibare maximă cu cele ale probelor de control, în aceeași perioadă.

56. Astfel, procentajul de inhibare a vitezei de creștere (I_r) se poate calcula pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarei formule:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

unde:

— $\%I_r$ =: procentajul de inhibare a vitezei medii specifice de creștere

— μ_C:: valoarea medie a μ în grupul de control

— μ_T:: valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

Randamentul

57. Efectele asupra randamentului se determină pe baza a două variabile de măsurare, numărul de fronde și încă o variabilă de măsurare (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă) prezentă în fiecare vas de testare la începutul și la sfârșitul testului. În cazul greutății uscate sau al greutății în stare proaspătă, biomasa inițială se determină pe baza unui eșantion de fronde recoltat din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare (a se vedea punctul 20). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările variației. Procentajul mediu de inhibare a randamentului (% I_y) se poate calcula pentru fiecare grup supus tratamentului după cum urmează:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

unde:

— % I_y : procentajul de reducere a randamentului

— b_C : biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control

— b_T : biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul supus tratamentului

Reprezentarea grafică a curbelor concentrație-răspuns

58. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentajului de inhibare a variabilei de răspuns (I_r sau I_y calculată conform descrierii de la punctul 56 sau 57) și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

Estimarea EC_x

59. Estimările EC_x (de exemplu EC_{50}) trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x), cât și pe randament (E_yC_x), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe numărul de fronde și o variabilă de măsurare suplimentară (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau greutatea în stare proaspătă). Aceasta se justifică deoarece există substanțe chimice de testare care au efecte diferite asupra numărului de fronde și a altor variabile de măsurare. Parametrii de toxicitate doriți sunt, prin urmare, patru valori de EC_x pentru fiecare nivel de inhibare x calculat: E_rC_x (numărul de fronde); E_rC_x (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau suprafața în stare proaspătă); E_yC_x (numărul de fronde); și E_yC_x (suprafața totală a frondelor, greutatea uscată sau suprafața în stare proaspătă).

Proceduri statistice

60. Obiectivul este de a obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în unități probit, logit sau Weibull (13), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile regulate. Când se apropie de zero sau inhibiție totală, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (13). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformatele probit, logit sau Weibull se folosesc în cazul datelor

▼M6

binare (de exemplu date privind mortalitatea sau supraviețuirea) și trebuie să fie modificate pentru a reflecta datele privind viteza de creștere și randamentul. Proceduri specifice de determinare a valorilor EC_x pe baza datelor continue se găsesc în referințele (14), (15) și (16).

61. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor EC_x. Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supuse tratamentului.

62. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute și folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (17), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.

63. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor de tratare folosind tehnici de analiză a variației (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară apoi cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau cel al lui Williams pot fi utile în acest sens (18)(19)(20)(21). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a variației se verifică. Această evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (22). Teste adecvate sunt cele ale lui Levene sau Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a variațelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea variației este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analizarea prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC se găsesc în referința (16).

64. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de a abandona conceptul de NOEC și înlocuirea sa cu estimări punctuale ale EC_x bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a x pentru acest test cu *Lemna*. Totuși un interval de 10-20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabilele de răspuns alese) și, de preferat, se raportează atât EC_{10}, cât și EC_{20}.

Raportare

65. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testare

— starea fizică și proprietățile fizico-chimice, inclusiv limita solubilității în apă;

— datele de identificare a substanței chimice (de exemplu numărul CAS), inclusiv puritatea (impurități).

Specia de testare:

— denumirea științifică, clona (dacă se cunoaște) și sursa.

Condiții de testare:

— procedura de testare folosită (statică, semistatică sau în regim dinamic);

— data începerii testului și durata sa;

— mediul de testare;

— descrierea proiectării testului: vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, numărul de colonii și fronde per vas de testare la începutul testului;

— concentrațiile de testare (nominale și măsurate, după caz) și numărul de probe duplicat per concentrație;

▼M6

— metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie;

— temperatura în timpul testului;

— sursa de lumină, intensitatea luminoasă și omogenitatea;

— valorile pH-ului mediilor de testare și de control;

— concentrațiile substanței chimice de testare și metoda de analiză cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, deviații standard sau limite de încredere ale analizelor);

— metodele de determinare a numărului de fronde și a altor variabile de măsurare, cum ar fi greutatea uscată, greutatea în stare proaspătă sau suprafața frondelor;

— orice abatere de la prezenta metodă de testare.

Rezultate:

— date brute: numărul de fronde și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control, cu ocazia fiecărei observări și analize;

— media și deviația standard pentru fiecare variabilă de măsurare;

— curbele de creștere pentru fiecare concentrație (recomandate cu variabila de măsurare transformată logaritmic, a se vedea punctul 55);

— timpul de duplicare/viteza de creștere în proba de control, pe baza numărului de fronde;

— variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;

— reprezentarea grafică a relației concentrație-efect;

— estimări ale punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, cum ar fi EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;

— dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);

— orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;

— orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observările soluțiilor de testare;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 pp.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 – 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

În sensul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții și prescurtări:

„Biomasă” înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație. În acest test, se măsoară de obicei înlocuitorii pentru biomasă, cum ar fi numărul de fronde sau suprafața frondelor, iar folosirea termenului „biomasă” se referă așadar și la măsurarea acestor înlocuitori.

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„Cloroză” înseamnă îngălbenirea țesutului frondei.

„Clonă” înseamnă un organism sau o celulă provenind de la un singur individ prin reproducere asexuată. Indivizii din aceeași clonă sunt, prin urmare, identici din punct de vedere genetic.

„Colonie” înseamnă un agregat de fronde mamă și fiică (de obicei 2-4) atașate unele de altele. Uneori, este denumită plantă.

„EC_x” înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu 50 %) a creșterii *Lemna* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau randament, se folosesc simbolurile „E_rC” pentru viteza de creștere, respectiv „E_yC” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E_rC (numărul de fronde).

„Test în regim dinamic” înseamnă un test în care soluțiile de testare sunt înlocuite continuu.

„Frondă” înseamnă structura individuală/unică având formă de frunză a unei plante de lintiță. Este cea mai mică unitate (individ) capabilă de reproducere.

„Gibozitate” înseamnă fronde care prezintă o proeminență sau umflătură.

„Creștere” înseamnă o sporire a variabilei de măsurare, cum ar fi numărul de fronde, greutatea uscată, greutatea umedă sau suprafața frondelor, în perioada de testare.

„Viteză de creștere” (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere.

„Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)” înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Toate concentrațiile testate mai mari decât LOEC trebuie să aibă totuși efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Dacă aceste două condiții nu pot fi satisfăcute, se va furniza o explicație completă privind modul în care a fost selectat LOEC (și, prin urmare, NOEC).

„Variabile de măsurare” înseamnă orice tip de variabilă care se măsoară pentru a exprima punctul final de testare prin folosirea uneia sau a mai multor variabile de răspuns diferite. În prezenta metodă, numărul de fronde, suprafața frondelor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată sunt variabile de măsurare.

„Monocultură” înseamnă o cultură cu o singură specie de plante.

„Necroză” înseamnă un țesut de frondă mort (alb sau îmbibat cu apă).

„Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC)” înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

„Fenotip” înseamnă caracteristica observabilă a unui organism determinată de interacțiunea genelor sale cu mediul său înconjurător.

„Variabilă de răspuns” înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. În cazul prezentei metode de testare, vitezele de creștere și randamentul reprezintă variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum numărul de fronde, suprafața frondelor, greutatea în stare proaspătă sau greutatea uscată.

▼**M6**

„Test (de reînnoire) semistatic” înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durata testului.

„Test static” înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durata testului.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

„Punctul final de testare” descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În prezenta metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

„Mediu de testare” înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care plantele testate cresc când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

„Randament” înseamnă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere.

▼M6

Apendicele 2

Descrierea *Lemna* spp.

Planta acvatică denumită uzual lintiță, *Lemna* spp., aparține familiei *Lemnaceae*, care conține un număr de specii grupate în patru genuri, răspândite în întreaga lume. Aspectul și taxonomia lor variate au fost descrise pe larg (1)(2). *Lemna gibba* și *L. minor* sunt specii reprezentative pentru zonele temperate, fiind folosite în mod obișnuit pentru teste de toxicitate. Ambele specii au o tulpină discoidală plutitoare sau submersă (frondă) și o rădăcină foarte subțire provenind din centrul suprafeței inferioare a fiecărei fronde. Speciile de *Lemna* înfloresc rareori, iar plantele se reproduc prin înmulțire vegetativă, producând fronde noi (3). În comparație cu plantele mai în vârstă, cele tinere tind să fie mai deschise la culoare, au rădăcini mai scurte și 2-3 fronde de dimensiuni diferite. Datorită dimensiunii reduse a *Lemna*, structurii sale simple, reproducerii asexuate și duratei scurte a unei generații, plantele din acest gen sunt adecvate în mare măsură pentru testele de laborator (4)(5).

Ca urmare a variației probabile între specii în ceea ce privește sensibilitatea, sunt valide doar comparațiile de sensibilitate realizate în cadrul aceleiași specii.

Exemple de specii de *Lemna* folosite pentru testare: Referințe bibliografice privind speciile

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major : Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (în limba suedeză).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Surse de specii de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Statele Unite ale Americii
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SUEDIA
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germania
e-mail: lemna@uba.de

BIBLIOGRAFIE

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

Apendicele 3

Întreținerea culturii stoc

Culturile stoc pot fi păstrate la temperaturi scăzute (4-10 °C) pentru perioade îndelungate de timp, fără a fi necesară refacerea. Mediul de cultură al *Lemna* poate fi identic cu cel folosit pentru testare, dar pentru culturile stoc pot fi folosite alte medii bogate în substanțe nutritive.

Un număr de plante tinere, de culoare verde-deschis, se transferă periodic, folosind o tehnică aseptică, în vase noi de cultură care conțin un mediu proaspăt. În condițiile de temperatură scăzută descrise anterior, subcultivarea poate avea loc la intervale de până la trei luni.

Se folosesc vase de cultură din sticlă, curate din punct de vedere chimic (curățate cu acid) și sterile, precum și tehnici de manipulare aseptică. În cazul contaminării culturii stoc, de exemplu cu alge sau ciuperci, se iau măsuri pentru eliminarea organismelor contaminante. În cazul algelor și al majorității celorlalte organisme contaminante, eliminarea are loc prin sterilizare de suprafață. Se recoltează un eșantion de material vegetal contaminat și se taie rădăcinile. Materialul se agită apoi energic în apă curată și se introduce într-o soluție de hipoclorit de sodiu 0,5 % (v/v) pentru o perioadă cuprinsă între 30 de secunde și 5 minute. Materialul vegetal se clătește apoi cu apă sterilă și se transferă, sub formă de loturi, în vase de cultură conținând mediu de cultură proaspăt. Un număr mare de fronde vor muri ca urmare a acestui tratament, în special dacă se folosesc perioade de expunere mai lungi, dar unele dintre cele care supraviețuiesc vor fi de obicei necontaminate. Acestea pot fi folosite ulterior pentru reinocularea noilor culturi.

▼**M6**

Apendicele 4

Medii

Pentru *L. minor* și *L. gibba* se recomandă medii de cultură diferite. În cazul *L. Minor* se recomandă un mediu modificat conform standardului suedez (SIS), în timp ce pentru *L. gibba* se recomandă mediul 20X AAP. Compozițiile ambelor medii sunt prezentate mai jos. Pentru pregătirea acestor medii se folosesc reactivi sau substanțe chimice de puritate analitică și apă deionizată.

Mediul de cultură pentru *Lemna* conform standardului suedez (SIS)

— Soluțiile stoc I-V se sterilizează prin autoclavare (120 °C, 15 minute) sau prin filtrare prin membrană (diametrul porilor de aproximativ 0,2 μm).

— Soluțiile stoc VI (și, opțional, VII) se sterilizează exclusiv prin filtrare prin membrană; nu se supun autoclavării.

— Soluțiile stoc sterile se păstrează la întuneric și temperatură scăzută. Soluțiile stoc I-V se elimină după șase luni, în timp ce soluțiile stoc VI (și, opțional, VII) au o perioadă de valabilitate de o lună.

Soluția stoc nr.:	Substanța	Concentrația în soluția stoc (g/l)	Concentrația în mediul preparat (mg/•l)	Mediul preparat	
				Element	Concentrație (mg/•l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampon)	490	490	—	—

Pentru pregătirea unui litru de mediu SIS se adaugă următoarele ingrediente la 900 ml de apă deionizată:

▼**M6**

— 10 ml de soluție stoc I

— 5 ml de soluție stoc II

— 5 ml de soluție stoc III

— 5 ml de soluție stoc IV

— 1 ml de soluție stoc V

— 5 ml de soluție stoc VI

— 1 ml de soluție stoc VII (opțional).*Notă:* O soluție stoc VII suplimentară (tampon MOPS) poate fi necesară pentru anumite substanțe chimice de testare (a se vedea punctul 11).

pH-ul se ajustează la 6,5 ± 0,2 cu 0,1 sau 1 mol de HCl sau NaOH, iar volumul se completează până la un litru cu apă deionizată.

Mediul de cultură 20X AAP

Soluțiile stoc se prepară în apă distilată sau deionizată sterilă.

Soluțiile stoc sterile se păstrează la întuneric și temperatură scăzută. În aceste condiții, soluțiile stoc au un termen de valabilitate de cel puțin 6-8 săptămâni.

Pentru mediul 20X-AAP se prepară cinci soluții stoc nutritive (A1, A2, A3, B și C), folosindu-se substanțe chimice cu puritate de reactiv. Pentru prepararea mediului de cultură se adaugă 20 ml din fiecare soluție stoc nutritivă la aproximativ 850 ml de apă deionizată. pH-ul se ajustează la 7,5 ± 0,1 cu 0,1 sau 1 mol de HCl sau NaOH, iar volumul se completează până la un litru cu apă deionizată. Mediul se filtrează apoi într-un recipient steril printr-un filtru cu membrană de (aproximativ) 0,2 μm.

Mediul de cultură destinat testării trebuie preparat cu 1-2 zile înainte de utilizare pentru a permite stabilizarea pH-ului. pH-ul mediului de cultură trebuie verificat înainte de utilizare și reajustat, dacă este necesar, prin adăugarea a 0,1 sau 1 mol de NaOH or HCl conform descrierii de mai sus.

Soluția stoc nr.:	Substanța	Concentrația în soluția stoc (g/l) (*)	Concentrația în mediul preparat (mg/•l) (*)	Mediul preparat	
				Element	Concentrație (mg/•l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na;N	190;84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Soluția stoc nr.:	Substanța	Concentrația în soluția stoc (g/l) (*)	Concentrația în mediul preparat (mg/•l) (*)	Mediul preparat	
				Element	Concentrație (mg/•l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na;C	220; 43

(*) În lipsa altor mențiuni

Notă: Concentrația finală de bicarbonat adecvată din punct de vedere teoretic (care asigură evitarea ajustărilor semnificative ale pH-ului) este de 15 mg/l, nu de 300 mg/l. Cu toate acestea, utilizarea anterioară a mediului 20X-AAP, inclusiv ring testul pentru prezenta orientare, se bazează pe 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Mediul STEINBERG (conform ISO 20079)

Concentrații și soluții stoc

Mediul Steinberg modificat este utilizat în ISO 20079 exclusiv pentru *Lemna minor* (deoarece doar *Lemna minor* este permisă în acest caz), dar testele au arătat că pot fi obținute rezultate bune și în cazul *Lemna gibba*.

Pentru pregătirea mediului se folosesc substanțe chimice cu puritate de reactiv sau de puritate analitică și apă deionizată.

Mediul nutritiv se prepară din soluții stoc sau din mediul cu o concentrație de 10 ori mai mare care permite concentrarea maximă a mediului fără precipitare.

Tabelul 1

mediu Steinberg cu pH stabilizat (modificat potrivit lui Altenburger)

Componentă		Mediu nutritiv	
Macroelemente	greutate molară	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Componentă		Mediu nutritiv	
Macroelemente	greutate molară	mg/l	mmol/l
Microelemente	greutate molară	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dihidrat de disodiu	372,24	1 500,00	4,03

Tabelul 2

Soluții stoc (Macroelemente)

1. Macroelemente (de 50 de ori mai concentrate)	**g/l**
Soluția stoc 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluția stoc 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluția stoc 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabelul 3

Soluții stoc (Microelemente)

2. Microelemente (de 1 000 de ori mai concentrate)	**mg/l**
Soluția stoc 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluția stoc 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluția stoc 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluția stoc 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluția stoc 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dihidrat de disodiu	1 500,00

— Soluțiile stoc 2 și 3, pe de o parte, și 4-7, pe de altă parte, pot fi combinate (respectând concentrațiile prevăzute).

▼**M6**

— Pentru obținerea unei perioade de valabilitate mai lungi, soluțiile stoc se autoclavează la 121 °C timp de 20 de minute sau, alternativ, se filtrează steril (0,2 μm). Filtrarea sterilă (0,2 μm) este ferm recomandată în cazul soluției stoc 8.

Prepararea concentrației finale a mediului STEINBERG (modificat)

— Se adaugă 20 ml de soluții stoc 1, 2 și 3 (a se vedea tabelul 2) la aproximativ 900 ml apă deionizată, pentru a se evita precipitarea.

— Se adaugă 1,0 ml de soluții stoc 4, 5, 6, 7 și 8 (a se vedea tabelul 3).

— pH-ul trebuie să fie de 5,5 +/– 0,2 (se ajustează prin adăugarea unui volum minim de soluție de NaOH sau HCl).

— Se completează cu apă până la 1 000 ml.

— Dacă soluțiile stoc sunt sterilizate și se folosește apă adecvată, nu este necesară sterilizarea suplimentară. Dacă mediul final este sterilizat, soluția stoc 8 se adaugă după autoclavare (la 121 °C, timp de 20 de minute).

Prepararea mediului STEINBERG (modificat) de 10 ori mai concentrat pentru depozitare intermediară

— Se adaugă 20 ml de soluții stoc 1, 2 și 3 (a se vedea tabelul 2) la aproximativ 30 ml apă pentru a se evita precipitarea.

— Se adaugă 1,0 ml de soluții stoc 4, 5, 6, 7 și 8 (a se vedea tabelul 3). Se completează cu apă până la 100 ml.

— Dacă soluțiile stoc sunt sterilizate și se folosește apă adecvată, nu este necesară sterilizarea suplimentară. Dacă mediul final este sterilizat, soluția stoc 8 se adaugă după autoclavare (la 121 °C, timp de 20 de minute).

— pH-ul mediului (concentrația finală) trebuie să fie de 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TEST DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 218 (2004) a OCDE. Această metodă de testare este concepută pentru evaluarea efectelor expunerii prelungite a substanțelor chimice la larvele de diptere de apă dulce din specia *Chironomus*, care trăiesc în sedimente. Se bazează pe protocoalele de testare a toxicității existente pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus tentans*, care au fost dezvoltate în Europa (1) (2) (3) și America de Nord (4) (5) (6) (7) (8) și testate prin comparare interlaboratoare (1) (6) (9). Se pot utiliza și alte specii de chironomide, despre care există documentație adecvată, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenariul de expunere utilizat în această metodă de testare este îmbogățirea sedimentului cu substanța testată. Selectarea scenariului de expunere adecvat depinde de intenția de aplicare a testului. Scenariul de îmbogățire a sedimentului are rolul de a simula niveluri acumulate de substanțe chimice care persistă în sediment. Acest sistem de expunere implică îmbogățirea sedimentului dintr-un sistem de testare tip apă-sediment.

3. De obicei, substanțele care trebuie să fie testate din punct de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă în acest compartiment pe perioade lungi de timp. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse printr-o serie de căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele puternic adsorbante (de exemplu, cu log K_{ow} > 5) sau pentru substanțe cu legături covalente cu sedimentul, ingestia de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate. Pentru a lua în considerare toate căile de expunere potențiale, această metodă de testare se concentrează pe expunerea pe termen lung. Durata de testare este în intervalul 20-29 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 28-65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care este nevoie de date pe termen scurt pentru un anumit scop, de exemplu pentru analiza efectelor unei substanțe chimice instabile, după o perioadă de zece zile se pot înlătura probele duplicat suplimentare.

4. Punctele finale măsurate sunt numărul total de adulți ieșiți din larve și durata până la emergență. Se recomandă ca măsurătorile ratei de supraviețuire și creștere a larvelor să se facă doar după o perioadă de zece zile, în cazul în care sunt necesare date suplimentare pe termen scurt, folosind probe duplicat suplimentare, după caz.

5. Se recomandă utilizarea de sediment preparat. Sedimentul preparat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:

   — variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea de a găsi surse de sediment necontaminate și curate;

   — testele pot fi inițiate în orice moment, fără să apară fenomenul de variație sezonieră în sedimentul de testare și nu este nevoie ca sedimentul să fie pretratat pentru înlăturarea faunei indigene; de asemenea, utilizarea sedimentului preparat reduce costul asociat cu colectarea pe teren a unor cantități suficiente de sediment, pentru testele de rutină;

   — utilizarea sedimentelor preparate permite compararea toxicității și clasificarea substanțelor în consecință.

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

▼M4

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomide în primul stadiu larvar sunt expuse unui interval de concentrații de substanță chimică testată în sistemele apă-sediment. Substanța de testare este îmbogățită în sediment și apoi larvele în primul stadiu sunt introduse în pahare Berzelius în care s-au stabilizat concentrațiile de sediment și apă. La sfârșitul testului se măsoară rata de emergență și dezvoltare a chironomidelor. De asemenea, dacă este necesar se pot măsura și rata de supraviețuire și greutatea larvelor (cu ajutorul unor probe duplicat suplimentare, după caz). Aceste date sunt analizate fie printr-un model de regresie, pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu × % a ratei de emergență sau supraviețuire sau creștere a larvelor (de exemplu, EC_{15}, EC_{50} etc.), fie prin testarea ipotezei statistice, pentru a determina CFEO/CMEO. Pentru această ultimă metodă este nevoie de compararea valorilor de efect cu valorile de control, cu ajutorul testelor statistice.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să se cunoască solubilitatea substanței testate în apă, presiunea de vapori, măsurată sau calculată, partiția în sediment și stabilitatea în apă și în sediment. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute. Informații utile includ formula structurală și puritatea substanței testate. Evoluția chimică a substanței testate (de exemplu, disipare, degradare abiotică și biotică etc.) este o altă informație utilă. Îndrumări suplimentare privind substanțele testate cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (12).

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic, ca mijloc de asigurare a fiabilității protocolului de testare și a condițiilor de testare. Exemple de substanțe toxice utilizate cu succes în testele de comparare interlaboratoare și în studiile de validare: lindan, trifuralin, pentaclorfenol, clorură de cadmiu și clorură de potasiu (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— la sfârșitul testului, emergența în vasele de control trebuie să fie de cel puțin 70 % (1) (6);

— apariția de *C. riparius* și *C. yoshimatsui* la adulți din vasele de control trebuie să aibă loc între 12 și 23 de zile după inserarea în vase; pentru *C. tentans* este nevoie de o perioadă de la 20 până la 65 de zile;

— la sfârșitul testului, în fiecare vas trebuie să se măsoare pH-ul și concentrația de oxigen dizolvat. Concentrația de oxigen trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (VSA) la temperatura utilizată, iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie în intervalul 6-9, în toate vasele de testare;

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,0 °C. Temperatura apei poate fi controlată printr-o cameră izotermică, iar în acest caz temperatura camerei trebuie să fie confirmată într-un interval de timp corespunzător.

▼M4

DESCRIEREA METODEI

Vase de testare

11. Studiul este efectuat în pahare Berzelius din sticlă de 600 ml, cu diametru de 8 cm. Se pot folosi și alte recipiente, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm^2 pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, teflon).

Alegerea speciei

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. Este potrivită și specia *Chironomus tentans*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. Se poate utiliza și *Chironomus yoshimatsui*. Detalii privind metodele de cultură sunt prezentate în apendicele 2, pentru *Chironomus riparius*. Sunt disponibile și informații despre condițiile de cultură pentru alte specii, adică *Chironomus tentans* (4) și *Chironomus yoshimatsui* (11). Identificarea speciei trebuie să se facă înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură internă.

Sediment

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment preparat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu chironomidele sau care le-ar putea consuma. De asemenea, se recomandă ca, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. Pentru acest test se recomandă următorul sediment preparat, care are la bază solul artificial utilizat în metoda de testare C.8 (14) (1) (15) (16):

(a) 4-5 % (greutate uscată) turbă: cu un pH cât mai aproape de 5,5-6,0; este important să se folosească turbă sub formă de pulbere, fin măcinată (dimensiunea particulei de ≤ 1 mm) și doar uscată cu aer;

(b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);

(c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200 μm);

(d) se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30-50 %;

(e) se adaugă carbonat de calciu cu calitate chimică pură ($CaCO_3$), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la 7,0 ± 0,5. Conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % (± 0,5 %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, caolin și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici etc.). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul este suficient condiționat.

▼M4

Apă

15. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil, așa cum este prezentat în apendicele 2 și 4, este potrivit ca apă pentru testare. Orice apă potrivită, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apa de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare, dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l $CaCO_3$. Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Parametrii de calitate a apei prezentați în apendicele 4 trebuie să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

Soluții stoc – Sedimente îmbogățite

16. De obicei, sedimentele îmbogățite, cu o anumită concentrație, sunt preparate prin adăugarea unei soluții de substanță testată direct în sediment. O soluție stoc a substanței testate dizolvate în apa deionizată este amestecată cu sedimentul preparat cu ajutorul unei mori cu valțuri, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. Dacă este puțin solubilă în apă, substanța testată se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform). Această soluție este apoi amestecată cu 10 g de nisip cuarțos fin pentru fiecare vas de testare. Se lasă să se evapore solventul, care trebuie să fie complet eliminat din nisip; apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment pentru fiecare pahar Berzelius. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței testate se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. E necesar să se țină cont de faptul că nisipul provenit din amestecul de substanță testată și nisip trebuie să fie luat în considerare atunci când se prepară sedimentul (adică sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip). Trebuie să se verifice distribuirea completă și uniformă în sediment a substanței testate care se adăugă la sediment. La nevoie, se pot analiza subprobe pentru determinarea gradului de omogenitate.

PROTOCOLUL TESTULUI

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de larve pentru fiecare vas. Sunt descrise modelele pentru estimarea punctuală a CE, pentru estimarea CFEO și pentru efectuarea unui test la valori-limită.

Modelul pentru analiza de regresie

18. Concentrațiile cu efect (de exemplu CE_{15}, CE_{50}) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie să fie cuprinse în domeniul concentrațiilor incluse în test. În general, precizia și în special validitatea cu care se pot face estimările concentrațiilor de efect (CE_x) sunt mai bune atunci când concentrația de efect se încadrează în limitele concentrațiilor testate. Trebuie să se evite extrapolarea mult sub nivelul celei mai mici concentrații pozitive sau peste nivelul celei mai mari concentrații. Este util să se facă un test preliminar de stabilire a intervalului, pentru a selecta gama de concentrații care vor fi utilizate (a se vedea punctul 27).

▼M4

19. Atunci când se estimează CE_x, trebuie să se testeze cel puțin cinci concentrații și trei probe duplicat pentru fiecare concentrație. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a dozei are o înclinare mică). Numărul de probe duplicat la fiecare tratare poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. La creșterea numărului de duplicate sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta. Atunci când trebuie să se estimeze rata de supraviețuire și de creștere a larvelor într-un interval de 10 zile, este nevoie de duplicate suplimentare.

Modelul pentru estimarea CFEO/CMEO

20. Atunci când urmează să se estimeze CMEO sau CFEO, trebuie să se utilizeze cinci concentrații de testare cu cel puțin patru duplicate, iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de probe duplicat trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ($p = 0,05$). Pentru rata de dezvoltare, de obicei se recomandă analiza variației (ANOVA), cum ar fi testul lui Dunnett sau testul lui Williams (17) (18) (19) (20). Pentru rata de emergență, se pot utiliza testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecția Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel.

Test la valori-limită

21. Se poate efectua un test la valori-limită (o concentrație de testare și martor) atunci când nu s-au observat efecte în testul preliminar de stabilire a intervalului. Scopul testului la valori-limită este de a efectua un test la o concentrație suficient de mare pentru a permite factorilor de decizie să excludă efectele posibil toxice ale substanței testate, iar limita este stabilită la o concentrație care nu este așteptată să apară în nicio situație. Se recomandă 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicat atât pentru loturile tratate, cât și pentru cele martor. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de lotul martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ($p = 0,05$). Cu răspuns metric (rată de dezvoltare și greutate), testul t este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, varianțe omogene). În cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe, se pot utiliza testul t pentru varianțe inegale sau un test nonparametric, cum ar fi testul Wilcoxon-Mann-Whithey. Pentru rata de emergență este adecvat testul exact al lui Fisher.

PROCEDURĂ

Condiții de expunere

Prepararea sistemului apă-sediment îmbogățit

22. Procedura de îmbogățire descrisă în metoda de testare C.8: Toxicitatea la râme este recomandată pentru aplicarea substanței testate (14). Sedimentele îmbogățite sunt puse în vase și se adaugă apă acoperitoare, pentru a ajunge la un raport de volum sediment-apă de 1:4 (a se vedea punctele 11 și 15). Adâncimea stratului de sediment trebuie să fie între 1,5 și 3 cm. Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și repunerea în suspensie a materiei fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive.

23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). La nevoie, în timpul studiului se completează apa până la volumul inițial, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să fie făcută cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri.

▼M4

Stabilizare

24. După adăugarea de apă acoperitoare la sedimentul îmbogățit, este de preferat să se lase timp pentru separarea substanței testate din faza apoasă și trecerea ei în sediment (3) (4) (6) (13). De preferință, această operațiune trebuie să se facă în aceleași condiții de temperatură și aerare ca și cele utilizate în test. Perioada de timp corespunzătoare pentru echilibrare depinde de sediment și de substanța chimică și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4-5 săptămâni). Întrucât în această perioadă se poate produce degradarea multor substanțe chimice, nu se așteaptă atingerea echilibrului, dar se recomandă să se lase o perioadă de echilibrare de 48 de ore. La sfârșitul acestei perioade de echilibrare ulterioară, concentrația substanței testate trebuie să fie măsurată în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, cel puțin la concentrația cea mai mare și la una mai scăzută (a se vedea punctul 38). Aceste determinări analitice ale substanței testate permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor măsurate.

Adăugarea de organisme de testare

25. Cu patru până la cinci zile înainte de adăugarea organismelor de testare în vasele de testare, pontele trebuie să fie prelevate din culturi și plasate în vase mici, în mediu de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură vechi, provenit din cultura-mamă, sau un mediu proaspăt preparat. În cazul în care se recurge la a doua metodă, la mediul de cultură trebuie să se adauge o cantitate mică de hrană, de exemplu alge verzi și/sau câteva picături de filtrat de la o suspensie de hrană pentru pești fin măcinată (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar ponte proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze la câteva zile după ce sunt depuse ouăle (2 până la 3 zile pentru *Chironomus riparius* la 20 °C și 1 până la 4 zile pentru *Chironomus tentans* la 23 °C și *Chironomus yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvară are loc în patru stadii, fiecare cu o durată de 4-8 zile. În studiu trebuie să se utilizeze larve din primul stadiu (2-3 sau 1-4 zile după eclozare). Stadiul musculițelor poate fi verificat prin măsurarea lățimii capsulei cefalice (6).

26. Câte douăzeci de larve în primul stadiu sunt repartizate arbitrar la fiecare vas de testare care conține sediment îmbogățit și apă, cu ajutorul unei pipete cu vârf teșit. În timpul adăugării larvelor în vasele de testare trebuie să se oprească aerarea apei și ea trebuie să rămână oprită pentru încă 24 de ore după adăugarea larvelor (a se vedea punctele 25 și 32). Conform protocolului de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve utilizate în funcție de concentrație este 60 pentru estimarea punctuală a CE și 80 pentru determinarea CFEO.

Concentrațiile de testare

27. Poate fi util un test de stabilire a intervalului, pentru a determina gama de concentrații pentru testul definitiv. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații de substanță testată, distribuite la intervale largi. Pentru a obține aceeași densitate de suprafață pentru chironomide, care va fi utilizată pentru testul definitiv, chironomidele sunt expuse la fiecare concentrație a substanței testate pentru o perioadă care permite estimarea unor concentrații de testare adecvate și nu este nevoie de duplicate.

28. Concentrațiile de testare pentru testul definitiv sunt decise pe baza rezultatului obținut în testul de stabilire a intervalului. Trebuie să se utilizeze cel puțin cinci concentrații, care să fie alese după metoda descrisă la punctele 18-20.

▼M4

Martori

29. În test trebuie să se includă vase cu probe-martor, care să nu conțină nicio substanță testată, dar în care să se afle sediment, cu un număr corespunzător de duplicate (a se vedea punctele 19-20). În cazul în care pentru aplicarea substanței testate s-a utilizat un solvent (a se vedea punctul 16), trebuie să se adauge un martor de solvent pentru sediment.

Sistem de testare

30. Sunt utilizate sisteme statice. Sistemele semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi folosite în cazuri excepționale, de exemplu în cazul în care specificațiile privind calitatea apei devin inadecvate pentru organismul testat sau afectează echilibrul chimic (de exemplu, nivelurile de oxigen dizolvat scad prea mult, concentrația de produse excretoare crește prea mult sau mineralele se dizolvă din sediment și afectează pH-ul și/sau duritatea apei). Totuși, în mod normal, alte metode de ameliorare a calității apei acoperitoare, cum ar fi aerarea, vor fi suficiente și de preferat.

Hrană

31. Larvele trebuie să fie hrănite, de preferință zilnic sau cel puțin de trei ori pe săptămână. Hrana pentru pești (o suspensie în apă sau hrană măcinată fin, de exemplu TetraMin sau TetraPhyll; a se vedea detalii în apendicele 2), o cantitate de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) pentru fiecare larvă, zilnic, pare a fi potrivită pentru larvele tinere în primele 10 zile. Pentru larvele mai mature poate fi necesară o cantitate de hrană ceva mai mare: o cantitate de 0,5-1 mg pentru fiecare larvă, zilnic, ar trebui să fie suficientă pentru restul testului. Rația de hrană trebuie să fie redusă în toate loturile tratate și în loturile martor, în cazul în care se observă creștere fungică sau atunci când se constată mortalitate în loturile martor. Atunci când nu se poate opri proliferarea fungică, testul trebuie să fie repetat. La testarea unor substanțe cu capacitate mare de adsorbție (de exemplu, cu log K_{ow} > 5) sau a unor substanțe cu legătură covalentă cu sedimentul, cantitatea de hrană necesară pentru asigurarea supraviețuirii și creșterii naturale a organismelor poate fi adăugată la sedimentul preparat înainte de perioada de stabilizare. Pentru aceasta, trebuie să se utilizeze material vegetal în loc de hrană pentru pești, de exemplu se poate adăuga o cantitate de 0,5 % (greutate uscată) frunze măcinate mărunt de urzică (*Urtica dioica*), de dud (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de alt material vegetal (*Cerophyl* sau celuloză alfa).

Condiții de incubare

32. Aerarea ușoară a apei acoperitoare în vasele de testare se face, de preferință, cu 24 de ore înainte de adăugarea larvelor și este urmărită pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenție concentrației de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din VSA). Aerarea se face printr-o pipetă Pasteur din sticlă, fixată la 2-3 cm deasupra stratului de sediment (una sau câteva bule de aer pe secundă). La testarea substanțelor chimice volatile, e bine să se aibă grijă să nu se aereze sistemul apă-sediment.

33. Testul se face la o temperatură constantă de 20 °C (± 2 °C). Pentru *C. tentans* și *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C și respectiv 25 °C (± 2 °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar nivelul de iluminare trebuie să fie de 500-1 000 de lucși.

▼M4

Durata de expunere

34. Expunerea începe cu adăugarea de larve la vasele cu probe îmbogățite și la cele cu probe-martor. Durata maximă de expunere este de 28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care musculițele ies mai devreme, testul poate fi încheiat după cel puțin cinci zile de la emergența ultimului adult din lotul-martor.

Observații

Emergență

35. Se determină perioada de dezvoltare și numărul total de musculițe masculi și femele deplin ieșite din stadiul de larvă. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

36. Vasele de testare trebuie să fie controlate cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a evalua vizual orice comportament anormal (de exemplu, părăsirea sedimentului, un mod neobișnuit de a înota), prin comparație cu lotul martor. În perioada de emergență probabilă este nevoie să se numere zilnic musculițele ieșite din stadiul de larvă. Zilnic se înregistrează sexul și numărul musculițelor ieșite complet din stadiul de larvă. După identificare, musculițele sunt scoase din vase. Orice ponte depuse înainte de terminarea testului trebuie să fie înregistrate și apoi înlăturate, pentru a preveni reintroducerea larvelor în sediment. De asemenea, se înregistrează numărul de pupe vizibile la care nu s-a produs emergența. În apendicele 5 se dau orientări privind măsurarea emergenței.

Creștere și supraviețuire

37. În cazul în care este nevoie de datele pe 10 zile privind supraviețuirea și creșterea larvelor, trebuie să se prevadă de la început vase de testare suplimentare, pentru a putea fi utilizate ulterior. Sedimentul din aceste vase suplimentare este cernut printr-o sită de 250 μm, pentru reținerea larvelor. Simptomele care indică moartea larvelor sunt imobilitatea sau lipsa de reacție la stimuli mecanici. Larvele care nu sunt recuperate trebuie să fie numărate tot ca larve moarte (există posibilitatea ca larvele care au murit la începutul testului să fi fost degradate de microbi). Se determină greutatea uscată (fără resturi de la larvele moarte) a larvelor supraviețuitoare din fiecare vas de testare, apoi se calculează greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas. Este util să se determine în ce stadiu de dezvoltare se află larvele supraviețuitoare; pentru aceasta, se poate măsura lățimea capsulei cefalice a fiecărui individ.

Măsurători analitice

Concentrația substanței testate

38. Înainte de începerea testului (adică adăugarea de larve), probe de sediment compact sunt înlăturate din cel puțin un vas pentru fiecare lot tratat, în vederea determinării analitice a concentrației substanței testate în sediment. Se recomandă, ca cerința minimă, ca probe din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment să fie analizate la începutul testului (a se vedea punctul 24) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai scăzută. Aceste determinări ale concentrației substanței testate furnizează informații despre comportamentul/separarea substanței testate în sistemul apă-sediment.

39. Atunci când se fac măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a șaptea) și când pentru analiză este nevoie de probe mari, care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe probe din vase de testare suplimentare, tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.

▼M4

40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C, timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța testată nu adsoarbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

Parametri fizico-chimici

41. Trebuie să se măsoare în mod corespunzător pH-ul și temperatura din vasele de testare (a se vedea punctul 10). Duritatea și conținutul de amoniac trebuie să fie măsurate în loturile martor și într-un vas de testare, la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

42. Scopul acestui test este să se determine efectul unei substanțe testate asupra ratei de dezvoltare și asupra numărului total de musculițe masculi și femele ieșite complet din stadiul de larvă sau, în cazul testului de 10 zile, efectele asupra supraviețuirii și greutății larvelor. În cazul în care nu există indicii de sensibilități diferite, din punct de vedere statistic, rezultatele obținute de la masculi și de la femele pot fi grupate, în scop statistic. Diferențele de sensibilitate între sexe pot fi interpretate statistic, de exemplu cu ajutorul unui test tabelar χ^2-r × 2. După zece zile trebuie să se determine rata de supraviețuire a larvelor și greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas, unde este cazul.

43. Concentrațiile de efect, exprimate și bazate pe greutatea uscată, sunt calculate, de preferință, pe baza concentrațiilor în sediment măsurate la începutul testului (a se vedea punctul 38).

44. Pentru a calcula o estimare punctuală pentru CE_{50} sau orice altă CE_x, se pot utiliza statisticile pentru fiecare vas, ca duplicate adevărate. La calcularea intervalului de încredere pentru orice CE_x, trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de redusă încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la statistica pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității varianței. Totuși, valorile CE_x trebuie să fie calculate după ce răspunsul revine la valoarea originală.

45. Atunci când analiza statistică are ca scop determinarea CFEO/CMEO prin testarea ipotezei statistice, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, de exemplu printr-o analiză a varianței cu mai multe criterii de clasificare. Alternativ, mai multe teste robuste (21) pot fi adecvate în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite.

Rată de emergență

46. Ratele de emergență sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton și când aceste date corespund așteptărilor. În caz contrar, se pot utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haenszel, cu valori p ajustate Bonferroni-Holm. Dacă există dovezi că variabilitatea între probe duplicat este mai mare, la aceeași concentrație, decât cea indicată de o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în (21).

▼M4

Se determină suma musculițelor ieșite în fiecare vas, n_e, care se împarte la numărul de larve introduse, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

unde:

ER = rata de emergență

n_e = numărul de musculițe ieșite în fiecare vas

n_a = numărul de larve introduse în fiecare vas

47. O alternativă mai potrivită pentru eșantioane de dimensiuni mari, atunci când există varianță extra-binomială, este tratarea ratei de emergență ca o reacție continuă și utilizarea unor proceduri, cum ar fi testul lui William, atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton, care corespunde cu aceste date ER. Testul lui Dunnett este potrivit în cazurile în care nu există monotonie. O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind un număr mai mare de cinci musculițe ieșite și cinci musculițe neieșite, pentru fiecare probă duplicat (vas).

48. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile ER trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea trigonometrică sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza variațele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea trigonometrică este aplicată prin preluarea arcsinusului ($\sin^{-1}$) rădăcinii pătrate a ER.

49. Pentru rate de emergență, valorile CE_x sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [sau, de exemplu, probit (22), logit, Weibull, un program informatic comercial corespunzător etc.]. În cazul în care analiza de regresie nu are succes (de exemplu, atunci când există mai puțin de două reacții parțiale), se utilizează alte metode nonparametrice, cum ar fi media mobilă sau interpolarea simplă.

Rată de dezvoltare

50. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și emergența cohortei experimentale de musculițe. (Pentru calculul duratei reale de dezvoltare, trebuie să se ia în considerare vârsta larvelor la momentul introducerii). Rata de dezvoltare este inversul duratei de dezvoltare (unitate: 1/zi) și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate a sedimentelor, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, procedurile de testare parametrică puternice se pot utiliza mai curând pentru rata de dezvoltare, decât pentru durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca reacție continuă, valorile CE_x pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu, (23), (24)].

51. Pentru testele statistice următoare, se presupune că numărul de musculițe observate la inspecția din ziua × au ieșit la jumătatea intervalului de timp dintre ziua × și ziua x – l (l = lungimea intervalului de inspecție, de obicei o zi). Rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas ($\overline{x}$) este calculată cu formula:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

unde:

$\bar{x}$: rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas

i: indicele intervalului de inspecție

m: numărul maxim de intervale de inspecție

f_i: numărul de musculițe ieșite în intervalul de inspecție i

n_e: numărul total de musculițe ieșite la sfârșitul experimentului ($= \sum f_i$)

x_i: rata de dezvoltare a musculițelor ieșite în intervalul i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

unde:

$ziua_i$: ziua inspecției (zile de la aplicare)

l_i: lungimea intervalului de inspecție i (zile, de obicei 1 zi)

Raport de testare

52. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța de testat:

— natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];

— datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate.

Speciile folosite pentru testare:

— animalele de testare utilizate: specie, denumire științifică, sursa organismelor și condițiile de reproducere;

— informații privind manipularea pontelor și a larvelor;

— vârsta animalelor testate la inserarea în vasele de testare.

Condițiile de testare:

— sedimentul folosit, adică sediment natural sau preparat;

— pentru sedimentul natural, localizarea și descrierea locului de prelevare a probelor, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristici: pH, conținut de carbon organic, raport C/N și granulometrie (dacă este cazul);

— prepararea sedimentului: ingrediente și caracteristici (conținut de carbon organic, pH, umiditate etc. la începutul testului);

— pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate etc. la începutul testului);

— adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;

— volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului ud cu și fără apă interstițială;

▼M4

— vasele de testare (material și dimensiune);

— metoda de îmbogățire a sedimentului: concentrații de testare utilizate, număr de probe duplicat și utilizarea solventului, dacă este cazul;

— faza de stabilizare de echilibru a sistemului apă-sediment îmbogățit: durată și condiții;

— condițiile de incubare: temperatură, ciclu de lumină și nivel de iluminare, aerare (frecvență și intensitate);

— informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

Rezultatele:

— valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasul de testare;

— calitatea apei în vasele de testare, adică pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și conținutul de amoniac;

— înlocuirea apei de testare evaporate, dacă este cazul;

— numărul de musculițe masculi și femele ieșite în fiecare vas și în fiecare zi;

— numărul de larve care nu s-au transformat în musculițe, în fiecare vas;

— greutatea medie individuală a larvelor în fiecare vas și pentru fiecare stadiu larvar, dacă este cazul;

— procentul de emergență pe fiecare probă duplicat și concentrația de testare (musculițe masculi și femele, împreună);

— rata medie de dezvoltare a musculițelor complet ieșite din stadiul de larvă pe fiecare probă duplicat și rata de tratare (musculițe masculi și femele împreună);

— estimări ale efectelor toxice, de exemplu CEx (și intervalele de încredere asociate), CFEO și/sau CMEO și metode statistice utilizate pentru determinarea lor;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738, August 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. În ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼**M4**

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J. și Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Metoda de testare C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme".

(15) Suedel B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚII

În cadrul acestei metode de testare se folosesc următoarele definiții și prescurtări:

Sedimentul preparat sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic: un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

Apa acoperitoare: apa plasată peste sediment în vasul de testare.

Apa interstițială: apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

Sedimentul îmbogățit: sedimentul la care se adaugă substanța testată.

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

Apendicele 2

Recomandări pentru cultura de *Chironomus riparius*

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip cuarțos într-un strat subțire, de circa 5-10 mm grosime. Un substrat adecvat s-a dovedit a fi și kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm. Apoi se adaugă apa corespunzătoare, la o adâncime de câțiva cm. Nivelurile de apă trebuie să fie completate la nevoie, pentru a compensa pierderea prin evaporare și pentru a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cutie adecvată, pentru a nu permite ca adulții emergenți să scape. Cutia trebuie să fie suficient de mare pentru a permite mișcarea în voie a adulților emergenți, altfel este posibil să nu apară copulația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).

2. Cutiile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la 20 ± 2 °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (la un nivel de iluminare de circa 1 000 de lucși), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

Apa de diluție

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit, se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă tuburile de larve.

Hrănirea larvelor

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă patentată similară de hrană pentru pești) la aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi administrată sub formă de pulbere măcinată uscată sau ca suspensie în apă: o cantitate de 1,0 g de hrană sub formă de fulgi se adaugă la 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat la o rată de circa 5 ml pentru fiecare vas și fiecare zi (a se agita înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai mare pot primi mai mult.

5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „neclar”, trebuie să se micșoreze cantitatea de hrană. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină hrană va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.

6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

Hrănirea adulților ieșiți din larve

7. Unele experimente au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții ieșiți din larve un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.

▼M4

Emergență

8. La 20 ± 2 °C, adulții vor începe să iasă din vasele de creștere a larvelor după aproximativ 13-15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

Ponte

9. După ce adulții sunt prezenți în cutia de creștere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de ponte gelatinoase. Dacă aceasta apare, pontele trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține o probă din apa în care au crescut. Pontele sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2-4 ponte/vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.

10. Larvele în primul stadiu ar trebui să eclozeze după 2-3 zile.

Pregătirea de noi vase de cultură

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce musculițele adulte au ieșit din larve. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de manipulare.

Prepararea soluțiilor de testare „M4” și „M7”

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este preparat la fel ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1, pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai scăzute în „M7” față de „M4”. Este în pregătire o publicație privind mediul „M7” (Elendt, comunicare personală). Soluția de testare nu trebuie să fie preparată conform indicațiilor lui Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 și K_2HPO_4 indicate pentru prepararea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

Prepararea mediului „M7”

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). 50 de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 sunt adăugate la un litru de apă deionizată, pentru a prepara mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. (Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote). Mediul este aerat și stabilizat.

BIBLIOGRAFIE:

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

▼**M4**

Tabelul 1

Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7

Soluții stoc (I)	Cantitate (mg) adăugată la un litru de apă deionizată	Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un litru de apă deionizată		Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Aceste substanțe diferă în M4 și M7, așa cum s-a indicat mai sus.
(2) Aceste soluții sunt preparate individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavizate imediat.

Tabelul 2

Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7

	Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg)	Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabelul 3

Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7. Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a obține o singură soluție stoc de vitamine

	Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg)	Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
Clorhidrat de tiamină	750	0,1	0,075
Ciancobalamină (B12)	10	0,1	0,0010
Biotină	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIE:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apendicele 3

PREPARAREA SEDIMENTULUI

Compoziția sedimentului

Compoziția sedimentului preparat trebuie să fie următoarea:

Constituent	Caracteristici	% de sediment greutate uscată
Turbă	Mușchi de turbă (Sphagnum), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5-6,0, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor ≤ 1 mm) și uscat cu aer	4-5
Nisip cuarțos	Granulație: > 50 % din particule trebuie să fie în intervalul 50-200 μm	75-76
Argilă caolinitică	Conținut de caolinit ≥ 30 %	20
Carbon organic	Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip	2 (± 0,5)
Carbonat de calciu	$CaCO_3$, pulverizat, pur din punct de vedere chimic	0,05-0,1
Apă	Conductivitate ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparare

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la 5,5 ± 0,5 cu $CaCO_3$. Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la 20 ± 2 °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie între 6,0 ± 0,5. Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolin) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în gama de 30-50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, se recomandă ca sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

Depozitare

Constituenții uscați pentru prepararea sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în cadrul testului. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea.

BIBLIOGRAFIE:

Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Apendicele 4

Caracteristici chimice acceptabile ale apei de diluție

Substanță	Concentrații
Particule în suspensie	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 μg/l
Duritate ca $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Clor rezidual	< 10 μg/l
Total pesticide organofosforice	< 50 ng/l
Total pesticide organofosforice plus bifenil policlorurat	< 50 ng/l
Total clor organic	< 25 ng/l

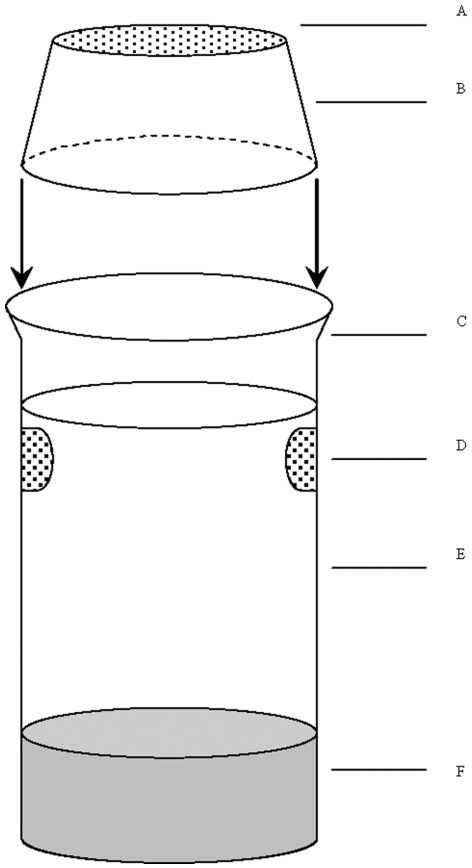
(*) Totuși, trebuie notat faptul că în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).

▼**M4**

Apendicele 5

Orientări pentru monitorizarea emergenței larvelor de chironomide

Pe paharele Berzelius de testare sunt plasate capcane de emergență. Aceste capcane sunt necesare începând din a douăzecea zi până la sfârșitul testului. În figura de mai jos se prezintă un exemplu de capcană utilizată:



A: sită de nailon

B: cupe de plastic răsturnate

C: pahar Berzelius fără muchie, pentru expunere

D: orificii cu sită, pentru schimbul de apă

E: apă

F: sediment

▼M4

C. 28. **TESTUL DE TOXICITATE ASUPRA CHIRONOMIDELOR ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT CU APĂ ÎMBOGĂȚITĂ**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea 219 (2004) a OCDE. Această metodă de testare este concepută pentru evaluarea efectelor expunerii prelungite a substanțelor chimice la larvele de diptere de apă dulce din specia *Chironomus*, care trăiesc în sedimente. Ea se bazează în principal pe orientările BBA, folosind un sistem de testare apă-sediment cu sol artificial și un scenariu de expunere cu coloană de apă (1). De asemenea, ține cont de protocoalele de testare a toxicității existente pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus tentans*, care au fost dezvoltate în Europa și America de Nord (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) și testate prin comparare interlaboratoare (1) (6) (9). Se pot utiliza și alte specii de chironomide, despre care există documentație adecvată, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Scenariul de expunere utilizat în această metodă de testare este îmbogățirea apei. Selectarea scenariului de expunere adecvat depinde de aplicarea intenționată a testului. Scenariul de expunere pentru apă, care implică îmbogățirea coloanei de apă, este menit să simuleze o pulverizare cu pesticide și acoperă valoarea maximă inițială a concentrațiilor în apa interstițială. De asemenea, este util pentru alte tipuri de expunere (inclusiv scurgerile chimice), cu excepția proceselor de acumulare care durează mai mult decât perioada de testare.

3. De obicei, substanțele care trebuie să fie testate din punct de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă în acest compartiment pe perioade lungi de timp. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse printr-o serie de căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele puternic adsorbante (de exemplu, cu log K_{ow} > 5) sau pentru substanțe cu legături covalente cu sedimentul, ingestia de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate. Pentru a lua în considerare toate căile de expunere potențiale, această metodă de testare se concentrează pe expunerea pe termen lung. Durata de testare este în intervalul de 20-28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 28-65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care este nevoie de date pe termen scurt pentru un anumit scop, de exemplu pentru analiza efectelor unei substanțe chimice instabile, după o perioadă de zece zile se pot înlătura probele duplicat suplimentare.

4. Punctele finale măsurate sunt numărul total de adulți ieșiți și durata până la emergență. Se recomandă ca măsurătorile ratei de supraviețuire și creștere a larvelor să se facă doar după o perioadă de zece zile, în cazul în care sunt necesare date suplimentare pe termen scurt, folosind probe duplicat suplimentare, după caz.

5. Se recomandă utilizarea de sediment preparat. Sedimentul preparat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:

— variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea de a găsi surse de sediment necontaminate și curate;

— testele pot fi inițiate în orice moment, fără să apară fenomenul de variație sezonieră în sedimentul de testare și nu este nevoie ca sedimentul să fie pretratat pentru înlăturarea faunei indigene; de asemenea, utilizarea sedimentului preparat reduce costul asociat cu colectarea pe teren a unor cantități suficiente de sediment, pentru testele de rutină;

▼M4

— utilizarea de sediment preparat permite comparații de toxicitate și clasificarea substanțelor în consecință: datele de toxicitate din teste cu sedimente naturale și artificiale au fost comparabile pentru mai multe substanțe chimice (2).

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomidele în primul stadiu larvar sunt expuse la o gamă de concentrații de substanță chimică testată în sistemele apă-sediment. Testul începe prin plasarea larvelor în primul stadiu în paharele Berzelius de testare care conțin sistemul apă-sediment, urmată de îmbogățirea substanței testate în apă. La sfârșitul testului se măsoară rata de emergență și dezvoltare a chironomidelor. Dacă este necesar se pot măsura, după 10 zile, și rata de supraviețuire și greutatea larvelor (cu ajutorul unor probe duplicat suplimentare, după caz). Aceste date sunt analizate fie printr-un model de regresie, pentru a estima concentrația care ar produce o reducere cu × % a ratei de emergență, supraviețuire sau creștere a larvelor (de exemplu, EC_{15}, EC_{50} etc.), fie prin testarea ipotezei statistice, pentru a determina CFEO/CMEO. Pentru această ultimă metodă este nevoie de compararea valorilor de efect cu valorile de control, cu ajutorul testelor statistice.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să se cunoască solubilitatea substanței testate în apă, presiunea de vapori, măsurată sau calculată, partiția în sediment și stabilitatea în apă și în sediment. Este oportun să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute. Informații utile includ formula structurală și puritatea substanței testate. Evoluția chimică a substanței testate (de exemplu, disipare, degradare abiotică și biotică etc.) este o altă informație utilă. Îndrumări suplimentare privind substanțele de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (12).

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic, ca mijloc de asigurare a fiabilității protocolului de testare și a condițiilor de testare. Exemple de substanțe toxice utilizate cu succes în testele de comparare interlaboratoare și în studiile de validare sunt: lindan, trifuralin, pentaclorfenol, clorura de cadmiu și clorura de potasiu. (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— la sfârșitul testului, emergența în vasele cu loturi martor trebuie să fie de cel puțin 70 % (1) (6);

— emergența *C. riparius* și *C. yoshimatsui* din larve în adulți din vasele cu loturi martor trebuie să aibă loc între 12 și 23 de zile după inserarea în vase; pentru *C. tentans* este nevoie de o perioadă de la 20 până la 65 de zile;

— la sfârșitul testului, în fiecare vas trebuie să se măsoare pH-ul și concentrația de oxigen dizolvat. Concentrația de oxigen trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (VSA) la temperatura utilizată, iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie în intervalul 6-9, în toate vasele de testare;

▼M4

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,0 °C. Temperatura apei poate fi controlată printr-o cameră izotermică, iar în acest caz temperatura camerei trebuie să fie confirmată într-un interval de timp corespunzător.

DESCRIEREA METODEI

Vase de testare

11. Studiul este efectuat în pahare Berzelius din sticlă de 600 ml, cu diametru de 8 cm. Se pot folosi și alte recipiente, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm^2 pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Se recomandă ca recipientele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, teflon).

Alegerea speciei

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. *Este potrivită și specia Chironomus tentans*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. *Se poate utiliza și Chironomus yoshimatsui*. Detalii privind metodele de cultură sunt date în apendicele 2, pentru *Chironomus riparius*. Sunt disponibile și informații despre condițiile de cultură pentru alte specii, adică *Chironomus tentans* (4) și *Chironomus yoshimatsui* (11). Identificarea speciei trebuie să se facă înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură internă.

Sediment

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment preparat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu chironomidele sau care le-ar putea consuma. De asemenea, se recomandă ca, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. Pentru acest test se recomandă următorul sediment preparat, care are la bază solul artificial utilizat în metoda de testare C.8 (14) (1) (15) (16):

(a) 4-5 % (greutate uscată) turbă: cu un pH cât mai aproape de 5,5-6,0 %; este important să se folosească turbă sub formă de pulbere, fin măcinată (dimensiunea particulei de ≤ 1 mm) și doar uscată cu aer;

(b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);

(c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200 μm);

(d) se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30-50 %;

(e) se adaugă carbonat de calciu cu calitate chimică pură (CaCO3), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la 7,0 ± 0,5;

(f) conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % (± 0,5 %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

▼M4

14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, argilă caolin și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici etc.). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul este suficient condiționat.

Apă

15. Orice tip de apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluare de nivel acceptabil, așa cum este prezentat în apendicele 2 și 4, este potrivit ca apă pentru testare. Orice apă potrivită, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apa de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare, dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l $CaCO_3$. Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Parametrii de calitate a apei prezentați în apendicele 4 trebuie să fie măsurați cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

Soluții stoc – Apă îmbogățită

16. Concentrațiile de testare se calculează pe baza concentrațiilor din coloana de apă, adică apa care acoperă sedimentul. Soluțiile testate, în concentrațiile alese, se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin dizolvarea substanței testate în mediul experimental. În unele cazuri, poate fi necesară folosirea solvenților sau a agenților de dispersie pentru a realiza o soluție stoc corespunzătoare, cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți potriviți sunt acetona, etanolul, metanolul, eterul monometilic de etilen glicol, eterul dimetilic de etilen glicol, dimetilformamida și trietilen glicolul. Agenții de dispersie care pot fi utilizați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația de agent de solubilizare în mediul de testare final trebuie să fie minimă (adică $\leq$ 0,1 ml/l) și să fie aceeași în toate loturile tratate. Când se folosește agent de solubilizare, acesta trebuie să nu provoace efecte semnificative asupra supraviețuirii sau efecte adverse vizibile asupra larvelor de chironomide, în testul pe un lot martor tratat numai cu solvent. Totuși, se va face tot posibilul să se evite folosirea unor astfel de materiale.

PROTOCOLUL TESTULUI

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și a intervalelor de concentrații testate, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de larve pe fiecare vas. Sunt descrise modelele pentru estimarea punctuală a CE, pentru estimarea CFEO și pentru efectuarea unui test la valori-limită. Analiza de regresie este preferabilă față de testarea ipotezei statistice.

Modelul pentru analiza de regresie

18. Concentrațiile cu efect (de exemplu CE_{15}, CE_{50}) și intervalul de concentrații în care efectul substanței testate prezintă interes trebuie să fie cuprinse în domeniul concentrațiilor incluse în test. În general, precizia și în special validitatea cu care se pot face estimările concentrațiilor de efect (CE_x) sunt mai bune atunci când concentrația de efect se încadrează în limitele concentrațiilor testate. Trebuie să se evite extrapolarea mult sub nivelul celei mai

▼M4

mici concentrații pozitive sau peste nivelul celei mai mari concentrații. Este util să se facă un test preliminar de stabilire a intervalului, pentru a selecta intervalul de concentrații care vor fi utilizate (a se vedea punctul 27).

19. Atunci când se estimează CE_x, trebuie să se testeze cel puțin cinci concentrații și trei probe duplicat pentru fiecare concentrație. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a dozei are o înclinare mică). Numărul de duplicate la fiecare tratare poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. La creșterea numărului de duplicate sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta. Atunci când trebuie să se estimeze rata de supraviețuire și de creștere a larvelor într-un interval de 10 zile, este nevoie de duplicate suplimentare.

Modelul pentru estimarea CFEO/CMEO

20. Atunci când urmează să se estimeze CMEO sau CFEO, trebuie să se utilizeze cinci concentrații de testare cu cel puțin patru probe duplicat, iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de probe duplicat trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ($p = 0,05$). Pentru rata de dezvoltare, de obicei se recomandă analiza variației (ANOVA), cum ar fi testul lui Dunnett sau testul lui Williams (17) (18) (19) (20). Pentru rata de emergență, se pot utiliza testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecția Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel.

Test la valori-limită

21. Se poate efectua un test la valori-limită (o concentrație de testare și martor) atunci când nu s-au observat efecte în testul preliminar de stabilire a intervalului. Scopul testului la valori-limită este să indice faptul că valoarea de toxicitate a substanței testate este mai mare decât limita de concentrație testată. În această metodă de testare nu se poate face nicio sugestie de concentrație recomandată; se lasă acest lucru la latitudinea organismelor de reglementare. De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicat atât pentru loturile tratate, cât și pentru cele martor. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de lotul martor, la un nivel de semnificație statistică de 5 % ($p = 0,05$). Cu răspuns metric (rată de dezvoltare și greutate), testul t este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, variațe omogene). În cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe, se pot utiliza testul t pentru variațe inegale sau un test nonparametric, cum ar fi testul Wilcoxon-Mann-Whithey. Pentru rata de emergență este adecvat testul exact al lui Fisher.

PROCEDURĂ

Condiții de expunere

Prepararea sistemului apă-sediment îmbogățit

22. În vasele de testare se adaugă cantități corespunzătoare de sediment preparat (a se vedea punctele 13-14 și apendicele 3), pentru a forma un strat de cel puțin 1,5 cm. Se adaugă apă până la adâncimea de 6 cm (a se vedea punctul 15). Raportul între adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei nu trebuie să fie mai mare de 1:4, iar stratul de sediment nu trebuie să fie mai adânc de 3 cm. Sistemul apă-sediment trebuie să fie lăsat timp de șapte zile în condiții de aerare ușoară, înainte de adăugarea organismelor testate (a se vedea punctul 14 și apendicele 3). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și repunerea în suspensie a materiei fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive.

▼M4

23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). La nevoie, în timpul studiului se completează apa până la volumul inițial, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să se facă cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri.

Adăugarea de organisme de testare

24. Cu patru până la cinci zile înainte de adăugarea organismelor de testare în vasele de testare, pontele trebuie să fie prelevate din culturi și plasate în vase mici, în mediu de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură vechi, provenit din cultura-mamă, sau un mediu proaspăt preparat. În cazul în care se recurge la a doua metodă, la mediul de cultură trebuie să se adauge o cantitate mică de hrană, de exemplu alge verzi și/sau câteva picături de filtrat de la o suspensie de hrană pentru pești fin măcinată (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar ponte proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze la câteva zile după ce sunt depuse ouăle (2 până la 3 zile pentru *Chironomus riparius* la 20 °C și 1 până la 4 zile pentru *Chironomus tentans* la 23 °C și *Chironomus yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvară are loc în patru stadii, fiecare cu o durată de 4-8 zile. În studiu trebuie să se utilizeze larve din primul stadiu (2-3 sau 1-4 zile după eclozare). Stadiul musculițelor poate fi verificat prin măsurarea lățimii capsulei cefalice (6).

25. Câte douăzeci de larve în primul stadiu sunt repartizate arbitrar la fiecare vas de testare care conține sediment îmbogățit și apă, cu ajutorul unei pipete cu vârf teșit. În timpul adăugării larvelor în vasele de testare trebuie să se oprească aerarea apei și ea trebuie să rămână oprită pentru încă 24 de ore după adăugarea larvelor (a se vedea punctele 24 și 32). Conform protocolului de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve utilizate în funcție de concentrație este 60 pentru estimarea punctuală a CE și 80 pentru determinarea CFEO.

26. La douăzeci și patru de ore după adăugarea larvelor, substanța testată este îmbogățită în coloana de apă acoperitoare și se asigură din nou o aerare ușoară. Cu ajutorul unei pipete, se aplică mici volume de soluții de substanță testată sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul.

Concentrațiile substanței testate

27. Poate fi util un test de stabilire a intervalului, pentru a determina gama de concentrații pentru testul definitiv. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații de substanță testată, distribuite la intervale largi. Pentru a obține aceeași densitate de suprafață pentru chironomide, care va fi utilizată pentru testul definitiv, chironomidele sunt expuse la fiecare concentrație a substanței testate pentru o perioadă care permite estimarea unor concentrații de testare adecvate și nu este nevoie de duplicate.

28. Concentrațiile de testare pentru testul definitiv sunt decise pe baza rezultatului obținut în testul de stabilire a intervalului. Trebuie să se utilizeze cel puțin cinci concentrații, care să fie alese după metoda descrisă la punctele 18-20.

Martori

29. În test trebuie să se includă vase cu probe-martor, care să nu conțină nicio substanță testată, dar în care să se afle sediment, cu un număr corespunzător de duplicate (a se vedea punctele 19-20). În cazul în care pentru aplicarea substanței testate s-a utilizat un solvent (a se vedea punctul 16), trebuie să se adauge un martor de solvent pentru sediment.

▼M4

Sistem de testare

30. Sunt utilizate sisteme statice. Sisteme semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi folosite în cazuri excepționale, de exemplu în cazul în care specificațiile privind calitatea apei devin inadecvate pentru organismul testat sau afectează echilibrul chimic (de exemplu, nivelurile de oxigen dizolvat scad prea mult, concentrația de produse excretoare crește prea mult sau minerale se dizolvă din sediment și afectează pH-ul și/sau duritatea apei. Totuși, în mod normal, alte metode de ameliorare a calității apei acoperitoare, cum ar fi aerarea, vor fi suficiente și de preferat.

Hrană

31. Larvele trebuie să fie hrănite, de preferință zilnic sau cel puțin de trei ori pe săptămână. Hrana pentru pești (o suspensie în apă sau hrană măcinată fin, de exemplu TetraMin sau TetraPhyll; a se vedea detalii în apendicele 2), o cantitate de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) pentru fiecare larvă, zilnic, pare adecvată pentru larvele tinere în primele 10 zile. Pentru larvele mai mature poate fi necesară o cantitate de hrană ceva mai mare: o cantitate zilnică de 0,5-1 mg pentru fiecare larvă ar trebui să fie suficientă pentru restul testului. Rația de hrană trebuie să fie redusă în toate loturile tratate și în loturile martor, în cazul în care se observă creștere fungică sau atunci când se constată mortalitate în loturile martor. Atunci când nu se poate opri proliferarea fungică, testul trebuie să fie repetat. La testarea unor substanțe cu capacitate mare de adsorbție (de exemplu, cu log K_{ow} > 5) sau a unor substanțe cu legătură covalentă cu sedimentul, cantitatea de hrană necesară pentru asigurarea supraviețuirii și creșterii naturale a organismelor poate fi adăugată la sedimentul preparat înainte de perioada de stabilizare. Pentru aceasta, trebuie să se utilizeze material vegetal în loc de hrană pentru pești, de exemplu se poate adăuga o cantitate de 0,5 % (greutate uscată) frunze măcinate mărunt de urzică (*Urtica dioica*), de dud (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de alt material vegetal (*Cerophyl* sau celuloză alfa).

Condiții de incubare

32. Aerarea ușoară a apei acoperitoare în vasele de testare se face, de preferință, cu 24 de ore după adăugarea larvelor și este urmărită pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenție concentrației de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din VSA). Aerarea se face printr-o pipetă Pasteur din sticlă, fixată la 2-3 cm deasupra stratului de sediment (adică una sau câteva bule de aer pe secundă). La testarea substanțelor chimice volatile, e bine să se aibă grijă să nu se aereze sistemul apă-sediment.

33. Testul se face la o temperatură constantă de 20 °C (± 2 °C). Pentru *C. tentans* și *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C și respectiv 25 °C (± 2 °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar nivelul de iluminare trebuie să fie de 500-1 000 de lucși.

Durata de expunere

34. Expunerea începe cu adăugarea de larve la vasele cu probe îmbogățite și la cele cu probe-martor. Durata maximă de expunere este de 28 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de 65 de zile pentru *C. tentans*. În cazul în care musculițele ies mai devreme, testul poate fi încheiat după cel puțin cinci zile de la emergența ultimului adult din lotul-martor.

OBSERVAȚII

Emergență

35. Se determină perioada de dezvoltare și numărul total de musculițe masculi și femele deplin ieșite din stadiul de larvă. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

▼M4

36. Vasele de testare trebuie să fie controlate cel puțin de trei ori pe săptămână, pentru a evalua vizual orice comportament anormal (de exemplu, părăsirea sedimentului, un mod neobișnuit de a înota), prin comparație cu lotul martor. În perioada de emergență probabilă este nevoie să se numere zilnic musculițele ieșite din stadiul de larvă. Zilnic se înregistrează sexul și numărul musculițelor ieșite complet din stadiul de larvă. După identificare, musculițele sunt scoase din vase. Orice ponte depuse înainte de terminarea testului trebuie să fie înregistrate și apoi înlăturate, pentru a preveni reintroducerea larvelor în sediment. De asemenea, se înregistrează numărul de pupe vizibile la care nu s-a produs emergența. În apendicele 5 se oferă orientări privind măsurarea emergenței.

Creștere și supraviețuire

37. În cazul în care este nevoie de datele pe 10 zile privind supraviețuirea și creșterea larvelor, trebuie să se prevadă de la început vase de testare suplimentare, pentru a putea fi utilizate ulterior. Sedimentul din aceste vase suplimentare este cernut printr-o sită de 250 μm, pentru reținerea larvelor. Simptomele care indică moartea larvelor sunt imobilitatea sau lipsa de reacție la stimuli mecanici. Larvele care nu sunt recuperate trebuie să fie numărate tot ca larve moarte (există posibilitatea ca larvele care au murit la începutul testului să fi fost degradate de microbi). Se determină greutatea uscată (fără resturi de la larvele moarte) a larvelor supraviețuitoare din fiecare vas de testare, apoi se calculează greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas. Este util să se determine în ce stadiu de dezvoltare se află larvele supraviețuitoare; pentru aceasta, se poate măsura lățimea capsulei cefalice a fiecărui individ.

Măsurători analitice

Concentrația substanței testate

38. Cerința minimă este ca probe din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment să fie analizate la începutul testului (de preferință, la o oră după aplicarea substanței testate) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai scăzută. Aceste determinări ale concentrației substanței testate furnizează informații despre comportamentul/partiția substanței testate în sistemul apă-sediment. Prelevarea de probe din sediment la începutul testului poate influența sistemul de testare (de exemplu, prin înlăturarea larvelor), astfel încât trebuie să se utilizeze vase de testare suplimentare pentru efectuarea determinărilor analitice la începutul și în timpul testului, după caz (a se vedea punctul 39). S-ar putea ca măsurătorile în sediment să nu fie necesare, în cazul în care partiționarea substanței testate între apă și sediment a fost clar determinată în cadrul unui studiu apă/sediment, în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment/apă, tipul de aplicare, conținutul de carbon organic al sedimentului).

39. Atunci când se fac măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a șaptea) și când pentru analiză este nevoie de probe mari, care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe probe din vase de testare suplimentare, tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.

40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C, timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța testată nu adsoarbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

▼M4

Parametri fizico-chimici

41. PH-ul, oxigenul dizolvat în apa de testare și temperatura din vasele de testare trebuie să fie măsurate în mod corespunzător (a se vedea punctul 10). Duritatea și conținutul de amoniac trebuie să fie măsurate în loturile martor și într-un vas de testare, la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

42. Scopul acestui test este să se determine efectul unei substanțe testate asupra ratei de dezvoltare și asupra numărului total de musculițe masculi și femele ieșite complet din stadiul de larvă sau, în cazul testului de 10 zile, efectele asupra supraviețuirii și greutății larvelor. În cazul în care nu există indicații privind sensibilități diferite, din punct de vedere statistic, rezultatele obținute de la masculi și de la femele pot fi grupate, în scop statistic. Diferențele de sensibilitate între sexe pot fi interpretate statistic, de exemplu cu ajutorul unui test tabelar χ^2-r × 2. După zece zile trebuie să se determine rata de supraviețuire a larvelor și greutatea uscată medie individuală pentru fiecare vas, unde este cazul.

43. Concentrațiile de efect exprimate ca și concentrații în apa acoperitoare sunt calculate, de preferință, pe baza concentrațiilor măsurate la începutul testului (a se vedea punctul 38).

44. Pentru a calcula o estimare punctuală pentru CE_{50} sau orice altă CE_x, se pot utiliza statisticile pentru fiecare vas, ca duplicate adevărate. La calcularea intervalului de încredere pentru orice CE_x, trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de redusă încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la statistica pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității variației. Totuși, valorile CE_x trebuie să fie calculate după ce reacția revine la valoarea originală.

45. Atunci când analiza statistică are ca scop determinarea CFEO/CMEO prin testarea ipotezei statistice, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, de exemplu printr-o analiză a variației cu mai multe criterii de clasificare. Alternativ, mai multe teste robuste (21) pot fi potrivite în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite.

Rată de emergență

46. Ratele de emergență sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se așteaptă o relație doză-reacție de tip monoton li când aceste date corespund așteptărilor. În caz contrar, se pot utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haenszel, cu valori p ajustate Bonferroni-Holm. În cazul în care există dovezi că variabilitatea între probe duplicat este mai mare, la aceeași concentrație, decât cea indicată de o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în (21).

47. Se determină suma musculițelor ieșite în fiecare vas, n_e, care se împarte la numărul de larve introduse, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

unde:

ER = rata de emergență

n_e = numărul de musculițe ieșite în fiecare vas

n_a = numărul de larve introduse în fiecare vas

48. O alternativă mai potrivită pentru probele de dimensiuni mari, atunci când există varianță extra-binomială, este tratarea ratei de emergență ca o reacție continuă și utilizarea unor proceduri, cum ar fi testul lui William, atunci când se așteaptă o relație doză-răspuns de tip monoton, care corespunde cu aceste date ER. Testul lui Dunnett este potrivit în cazurile în care nu există monotonie. O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind un număr mai mare de cinci musculițe ieșite și cinci musculițe neieșite, pentru fiecare probă identică (vas).

49. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile ER trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea trigonometrică sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza variațele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haenszel pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea trigonometrică este aplicată prin preluarea arcsinusului (sin^{-1}) rădăcinii pătrate a ER.

50. Pentru rate de emergență, valorile CE_x sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [sau, de exemplu, probit (22), logit, Weibull, un program informatic comercial corespunzător etc.]. În cazul în care analiza de regresie nu are succes (de exemplu, atunci când există mai puțin de două reacții parțiale), se utilizează alte metode nonparametrice, cum ar fi media mobilă sau interpolarea simplă.

Rată de dezvoltare

51. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și emergența cohortei experimentale de musculițe. (Pentru calculul duratei reale de dezvoltare, trebuie să se ia în considerare vârsta larvelor la momentul introducerii). Rata de dezvoltare este inversul duratei de dezvoltare (unitate: 1/zi) și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate a sedimentelor, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, procedurile de testare parametrică puternice se pot utiliza mai curând pentru rata de dezvoltare, decât pentru durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca reacție continuă, valorile CE_x pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu (23), (24)].

52. Pentru testele statistice următoare, se presupune că numărul de musculițe observate la inspecția din ziua × au ieșit la jumătatea intervalului de timp dintre ziua × și ziua x - 1 (l = lungimea intervalului de inspecție, de obicei o zi). Rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas ($\bar{x}$) este calculată cu formula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

unde:

$\bar{x}$: rata medie de dezvoltare pentru fiecare vas

i: indicele intervalului de inspecție

m: numărul maxim de intervale de inspecție

▼M4

f_i: numărul de musculițe ieșite în intervalul de inspecție i

n_e: numărul total de musculițe ieșite la sfârșitul experimentului (= $\sum f_i$)

x_i: rata de dezvoltare a musculițelor ieșite în intervalul i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

unde:

$ziua_i$: ziua inspecției (zile de la aplicare)

l_i: lungimea intervalului de inspecție i (zile, de obicei 1 zi)

Raport de testare

53. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța testată:

— natura fizică și, dacă sunt relevante, proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];

— datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței testate.

Speciile folosite pentru testare:

— animalele de testare utilizate: specie, denumire științifică, sursa organismelor și condițiile de reproducere;

— informații privind manipularea pontelor și a larvelor;

— vârsta animalelor testate la inserarea în vasele de testare.

Condițiile de testare:

— sedimentul folosit, adică sediment natural sau preparat;

— pentru sedimentul natural, localizarea și descrierea locului de prelevare a probelor, inclusiv, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristici: pH, conținut de carbon organic, raport C/N și granulometrie (dacă este cazul);

— prepararea sedimentului: ingrediente și caracteristici (conținut de carbon organic, pH, umiditate etc. la începutul testului);

— pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate etc. la începutul testului);

— adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;

— volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului ud cu și fără apă interstițială;

— vasele de testare (material și dimensiune);

— metoda de preparare a soluțiilor stoc și concentrațiile de testare;

▼M4

— aplicarea substanței testate; concentrația de testare utilizată, numărul de duplicate și utilizarea unui solvent, dacă este cazul;

— condițiile de incubare: temperatură, ciclu de lumină și nivel de iluminare, aerare (frecvență și intensitate);

— informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

Rezultatele:

— valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței testate în vasul de testare;

— calitatea apei în vasele de testare, adică pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și conținutul de amoniac;

— înlocuirea apei de testare evaporate, dacă este cazul;

— numărul de musculițe masculi și femele ieșite în fiecare vas și în fiecare zi;

— numărul de larve care nu s-au transformat în musculițe, în fiecare vas;

— greutatea medie individuală a larvelor în fiecare vas și pentru fiecare stadiu larvar, dacă este cazul;

— procentul de emergență pe fiecare probă identică și concentrația de testare (musculițe masculi și femele, împreună);

— rata medie de dezvoltare a musculițelor complet ieșite din stadiul de larvă pe fiecare probă identică și rata de tratare (musculițe masculi și femele împreună);

— estimări ale efectelor toxice, de exemplu CE_x (și intervalele de încredere asociate), CFEO și/sau CMEO și metode statistice utilizate pentru determinarea lor;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE:

(1) BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. În ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius),* Technical Report. Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*, Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986), Fundamental studies on Chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(14) Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme",

(15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995), Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment, Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints, Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Apendicele 1

DEFINIȚII

În cadrul prezentei metode de testare se folosesc următoarele definiții și prescurtări:

Sedimentul preparat sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic: un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

Apa acoperitoare: apa plasată peste sediment în vasul de testare.

Apa interstițială: apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

Apa îmbogățită: apa la care s-a adăugat substanța testată.

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

Apendicele 2

Recomandări pentru cultura de *Chironomus riparius*

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip cuarțos într-un strat subțire, de circa 5-10 mm grosime. Un substrat adecvat s-a dovedit a fi și kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm. Apoi se adaugă apa corespunzătoare, la o adâncime de câțiva cm. Nivelurile de apă trebuie să fie completate la nevoie, pentru a compensa pierderea prin evaporare și pentru a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cutie adecvată, pentru a nu permite ca adulții emergenți să scape. Cutia trebuie să fie suficient de mare pentru a permite mișcarea în voie a adulților emergenți, altfel este posibil să nu apară copulația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).

2. Cutiile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la 20 ± 2 °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (la un nivel de iluminare de circa 1 000 de lucși), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

Apa de diluție

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit, se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă tuburile de larve.

Hrănirea larvelor

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă patentată similară de hrană pentru pești) la aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi administrată sub formă de pulbere măcinată uscată sau ca suspensie în apă: o cantitate de 1,0 g de hrană sub formă de fulgi se adaugă la 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat la o rată de circa 5 ml pentru fiecare vas și fiecare zi (a se agita înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai mare pot primi mai mult.

5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „neclar”, trebuie să se micșoreze cantitatea de hrană. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină mâncare va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.

6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

Hrănirea adulților ieșiți din larve

7. Unele experimente au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții ieșiți din larve un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.

▼M4

Emergență

8. La 20 ± 2 °C, adulții vor începe să iasă din vasele de creștere a larvelor, după aproximativ 13-15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase.

Ponte

9. După ce adulții sunt prezenți în cutia de creștere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de ponte gelatinoase. Dacă aceasta apare, pontele trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține o probă din apa în care au crescut. Pontele sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2-4 ponte/vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.

10. Larvele în primul stadiu trebuie să eclozeze după 2-3 zile.

Pregătirea de noi vase de cultură

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce musculițele adulte au ieșit din larve. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de manipulare.

Pregătirea soluțiilor de testare „M4” și „M7”

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este preparat la fel ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1, pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai scăzute în „M7” față de „M4”. Este în pregătire o publicație privind mediul „M7” (Elendt, comunicare personală). Soluția de testare nu trebuie să fie preparată conform indicațiilor lui Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 și K_2HPO_4 indicate pentru prepararea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

Prepararea mediului „M7”

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). Cincizeci de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 se adăugă la un litru de apă deionizată, pentru a prepara mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. (Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote). Mediul este aerat și stabilizat.

Tabelul 1

Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7

Soluții stoc (I)	Cantitate (mg) adăugată la un litru de apă deionizată	Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un litru de apă deionizată		Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluții stoc (I)	Cantitate (mg) adăugată la un litru de apă deionizată	Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă la un litru de apă deionizată		Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ([1])	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ ([1])	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ([1])	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ ([1])	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ ([1])	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ ([1]) ([2])	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ ([1]) ([2])	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

([1]) Aceste substanțe diferă în M4 și M7, așa cum s-a indicat mai sus.
([2]) Aceste soluții sunt preparate individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavizate imediat.

Tabelul 2

Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7

	Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg)	Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabelul 3

Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7

Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a se obține o singură soluție stoc de vitamine.

	Cantitate adăugată la un litru de apă deionizată (mg)	Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
Clorhidrat de tiamină	750	0,1	0,075
Ciancobalamină (B12)	10	0,1	0,0010
Biotină	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFIE:

BBA (1995), Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp, Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990), Selenium Deficiency in Crustacean, Protoplasma 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990), Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*, Water Research 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apendicele 3

PREPARAREA SEDIMENTULUI

Compoziția sedimentului

Compoziția sedimentului preparat trebuie să fie următoarea:

Constituent	Caracteristici	% de sediment greutate uscată
Turbă	Mușchi de turbă (Sphagnum), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5-6,0, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor ≤ 1 mm) și uscat cu aer	4-5
Nisip cuarțos	Granulație: > 50 % din particule trebuie să fie în intervalul 50-200 μm	75-76
Argilă caolinitică	Conținut de caolinit ≥ 30 %	20
Carbon organic	Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip	2 (± 0,5)
Carbonat de calciu	$CaCO_3$, pulverizat, pur din punct de vedere chimic	0,05-0,1
Apă	Conductivitate ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparare

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la 5,5 ± 0,5 cu $CaCO_3$. Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la 20 ± 2 °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie între 6,0 ± 0,5. Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolin) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în gama de 30-50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea într-un test de toxicitate asupra chironomidelor, se recomandă ca sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

Depozitare

Constituenții uscați pentru prepararea sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în cadrul testului. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea.

BIBLIOGRAFIE:

Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998), Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media, Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

Apendicele 4

Caracteristici chimice acceptabile ale apei de diluție

Substanță	Concentrații
Particule în suspensie	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Duritate ca $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Clor rezidual	< 10 µg/l
Total pesticide organofosforice	< 50 ng/l
Total pesticide organofosforice plus bifenil policlorurat	< 50 ng/l
Total clor organic	< 25 ng/l

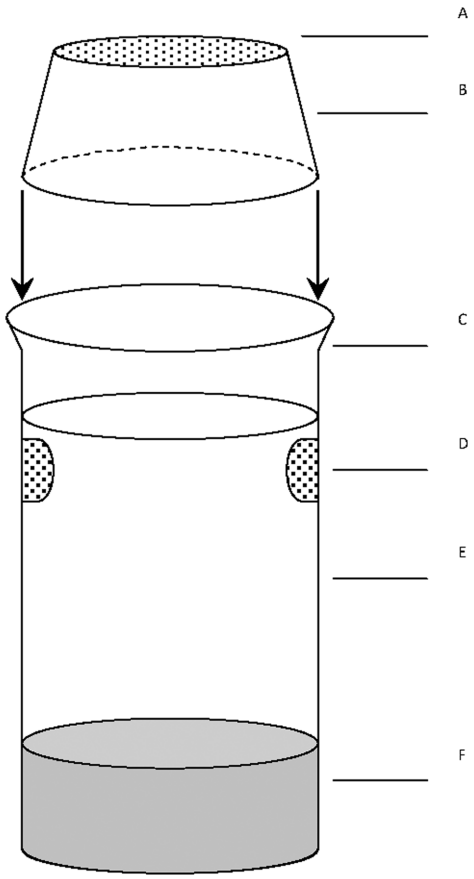
(*) Totuși, trebuie notat faptul că în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai scăzută (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).

▼**M4**

Apendicele 5

Orientări pentru monitorizarea emergenței larvelor de chironomide

Pe paharele Berzelius de testare sunt plasate capcane de emergență. Aceste capcane sunt necesare începând din a douăzecea zi până la sfârșitul testului. În figura de mai jos se prezintă un exemplu de capcană utilizată:



A: sită de nailon

B: cupe de plastic răsturnate

C: pahar Berzelius fără muchie, pentru expunere

D: orificii cu sită, pentru schimbul de apă

E: apă

F: sediment

▼M4

C.29. BIODEGRADABILITATEA RAPIDĂ – CO_2 ÎN VASE ÎNCHISE ERMETIC (TESTARE ÎN SPAȚIUL LIBER)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 310 (2006). Această metodă de testare este o metodă de screening pentru evaluarea biodegradabilității rapide a substanțelor chimice și furnizează informații similare celor obținute din cele șase metode de testare descrise la capitolul C.4 din prezenta anexă, A-F. Prin urmare, o substanță chimică care prezintă rezultate pozitive în cadrul acestei metode de testare poate fi considerată ca fiind ușor biodegradabilă și, în consecință, cu degradare rapidă în mediu.

2. Metoda bine stabilită (1) privind dioxidul de carbon (CO2), bazată pe testul Sturm original (2) pentru evaluarea biodegradabilității substanțelor chimice organice prin măsurarea dioxidului de carbon produs prin activitatea microbiană, a reprezentat, de obicei, prima alegere pentru testarea substanțelor chimice greu solubile și a celor care se adsorb puternic. Aceasta este selectată, de asemenea, pentru substanțele chimice solubile (nu însă și volatile), întrucât mulți consideră că degajarea dioxidului de carbon reprezintă singura dovadă fără echivoc a activității microbiene. Eliminarea carbonului organic dizolvat se poate realiza prin procese fizico-chimice – adsorbție, volatilizare, precipitare, hidroliză –, precum și prin activitate microbiană și prin numeroase reacții nebiologice care consumă oxigen; CO_2 rezultă rareori din substanțe chimice pe cale abiotică. În testul Sturm original și în cel modificat (1) (2), CO_2 este eliminat din faza lichidă în vase de absorbție prin barbotare (adică prin trecerea forțată a aerului tratat sub formă de bule prin mediul lichid pentru a elimina CO2), în timp ce în varianta Larson (3) (4), CO_2 este transferat din vasul de reacție în vasele de absorbție prin trecerea aerului fără CO_2 prin spațiul liber și, în plus, prin agitarea continuă a vasului de testare. Agitarea vasului de reacție se realizează numai în modificarea Larson; amestecarea este menționată numai pentru substanțele insolubile în ISO 9439 (5) și în varianta americană originală (6), ambele menționând barbotarea în locul înlocuirii spațiului liber. În altă metodă oficială a US EPA (Agenția americană pentru protecția mediului) (7), bazată pe metoda Gledhill (8), vasul de reacție agitat este izolat de atmosferă, iar CO_2 produs este colectat într-un separator alcalin interior direct din faza gazoasă, precum în cazul respirometrelor clasice Warburg/Barcroft.

3. Totuși, s-a demonstrat că, în timpul utilizării testului Sturm standard modificat, pentru o serie de substanțe chimice, carbonul anorganic (CA) se acumulează în mediu (9). Degradarea a 20 mg C/l de anilină a produs o concentrație de CA de 8 mg/l. Astfel, colectarea de CO_2 în separatoarele alcaline nu a reflectat fidel cantitatea de CO_2 produsă pe cale microbiologică în etapele intermediare din timpul degradării. Drept urmare, specificația referitoare la faptul că > 60 % din producția maximă teoretică de CO_2 (CO_2T) trebuie colectată într-o „fereastră de 10 zile” (cele 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % biodegradare) pentru ca o substanță chimică testată să fie clasificată ca ușor biodegradabilă, nu va fi îndeplinită de unele substanțe chimice care ar fi clasificate astfel folosind eliminarea carbonului organic dizolvat (COD).

4. Atunci când procentul de degradare are o valoare mai scăzută decât cea preconizată, este posibil ca în soluția experimentală să se acumuleze CA. În acest caz, degradabilitatea poate fi evaluată folosind celelalte teste de biodegradabilitate rapidă.

▼M4

5. Alte inconveniente ale metodei Sturm (greoaie, necesită mult timp, mai expusă la erori experimentale și nu este aplicabilă substanțelor chimice volatile) au determinat deja căutarea unei tehnici în vase închise ermetic, diferite de tehnica Gledhill, în locul circulației continue a gazului (10) (11). Boatman *et al.* (12) au analizat metodele anterioare și au adoptat un sistem cu spațiu liber închis în care CO_2 a fost eliberat în spațiul liber, la sfârșitul incubării, prin acidificarea mediului. CO_2 a fost măsurat prin cromatografie în faza gazoasă (CG)/analiza CA în probe prelevate automat din spațiul liber, însă nu s-a ținut cont de carbonul anorganic dizolvat (CAD) în faza lichidă. De asemenea, vasele folosite au fost foarte mici (20 ml) conținând numai 10 ml din mediu, ceea ce a determinat probleme, de exemplu atunci când se adaugă în mod obligatoriu cantități foarte mici de substanțe chimice de testat insolubile și/sau este posibil ca în mediul inoculat să nu existe sau să fie prezent un număr insuficient de microorganisme responsabile pentru degradarea substanțelor chimice testate.

6. Aceste dificultăți au fost depășite de studiile independente derulate de Struijs și Stoltenkamp (13) și de Birch și Fletcher (14), cel din urmă fiind inspirat de experiența acestora cu aparatura utilizată în testul de biodegradare anaerobă (15). În prima metodă menționată (13), CO_2 se măsoară în spațiul liber după acidificare și echilibrare, în timp ce în a doua metodă (14) CAD a fost măsurat în ambele faze, gazoasă și lichidă, fără interpretarea rezultatelor; mai mult de 90 % din CA format a fost prezent în faza lichidă. Ambele metode au prezentat avantaje față de testul Sturm prin faptul că sistemul de testare a fost mult mai compact și maniabil, pot fi testate substanțe chimice volatile și se previne posibilitatea de întârziere în măsurarea CO_2 produs.

7. Cele două abordări au fost combinate în standardul ISO privind CO_2 în spațiul liber (16), care a supus unui test de comparare interlaboratoare (17) și reprezintă standardul care stă la baza prezentei metode de testare. Cele două abordări au fost utilizate, în mod similar, în metoda US EPA (18). Au fost recomandate două metode de măsurare a CO_2, respectiv CO_2 în spațiul liber după acidificare (13) și CA în faza lichidă după adăugarea de substanță alcalină în exces. Ultima metodă a fost introdusă de Peterson în timpul testului de comparare interlaboratoare CONCAWE (19) al acestei metode a spațiului liber, modificată pentru măsurarea biodegradabilității intrinseci. Modificările aduse în 1992 (20) la revizuirea metodelor de la capitolul C.4 din prezenta anexă cu privire la biodegradabilitatea rapidă au fost încorporate în această metodă de testare, astfel încât condițiile (mediu, durată etc.) sunt asemănătoare cu cele din testul Sturm revizuit (20). Birch și Fletcher (14) au demonstrat că în această testare în spațiul liber s-au obținut rezultate foarte apropiate de cele obținute cu aceleași substanțe chimice în cadrul testului de comparare interlaboratoare realizat de OCDE (21) al metodelor de testare revizuite.

PRINCIPIUL TESTULUI

8. Substanța chimică testată, de obicei la o concentrație de 20 mg C/l, ca sursă unică de carbon și energie, este incubată într-un mediu de soluție tampon cu săruri minerale care a fost inoculat cu o populație mixtă de microorganisme. Testul se realizează în vase închise ermetic cu un spațiu liber plin cu aer, care asigură o rezervă de oxigen pentru biodegradarea aerobă. Degajarea CO_2 rezultat în urma biodegradării aerobe finale a substanței chimice testate se determină prin măsurarea excesului de CA produs în vasele de testare față de cel produs în vasele cu probă martor care conțin numai mediul inoculat. Gradul de biodegradare se exprimă ca procent din producția maximă teoretică de CA (CATh), pe baza cantității de substanță chimică testată (exprimată în carbon organic) adăugată inițial.

9. De asemenea, poate fi măsurată eliminarea COD și/sau gradul de biodegradare primară al substanței chimice testate (20).

▼M4

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

10. Conținutul de carbon organic (% masice) al substanței chimice care urmează a fi testată trebuie să fie cunoscut, fie pe baza structurii sale chimice, fie prin măsurare, astfel încât să poată fi calculat procentul de degradare. Pentru substanțele chimice volatile testate, este utilă măsurarea sau calcularea constantei legii lui Henry, pentru determinarea un raport volumetric spațiu liber-lichid adecvat. Informațiile privind toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor este utilă în selectarea unei concentrații adecvate a substanței testate și în interpretarea rezultatelor care indică o biodegradabilitate redusă: se recomandă includerea verificării efectului inhibitor, exceptând cazul în care se cunoaște faptul că substanța chimică testată nu inhibă activitățile microbiene (a se vedea punctul 24).

APLICABILITATEA METODEI

11. Testul este aplicabil substanțelor chimice testate solubile și insolubile în apă, trebuind totuși să se asigure o bună dispersie a substanței chimice testate. Utilizând raportul volumetric spațiu liber-lichid recomandat de 1:2, pot fi testate substanțe chimice volatile având o constantă a legii lui Henry de până la 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ întrucât proporția substanței chimice testate în spațiul liber nu va depăși 1 % (13). Se poate utiliza un volum mai mic al spațiului liber atunci când se testează substanțe chimice mai volatile, însă biodisponibilitatea acestora poate fi limitativă, mai ales dacă acestea prezintă o solubilitate redusă în apă. Totuși, utilizatorii trebuie să se asigure că raportul volumetric spațiu liber-lichid și concentrația substanței chimice testate sunt de așa natură încât este disponibil suficient oxigen pentru a se produce biodegradarea aerobă completă (de exemplu, evitarea utilizării unei concentrații mari a substratului și a unui volum mic al spațiului liber). Referințele (13) și (23) conțin informații privind această chestiune.

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

12. Pentru a verifica procedura de testare, ar trebui testată în paralel o substanță chimică de referință a cărei biodegradabilitate este cunoscută. În acest scop, poate fi utilizată anilină, benzoat de sodiu sau etilenglicol, atunci când se testează substanțe chimice testate solubile în apă, și 1-octanol, pentru substanțe chimice testate cu solubilitate redusă (13). Biodegradarea acestor substanțe chimice trebuie să atingă > 60 % CATh în decurs de 14 zile.

REPRODUCTIBILITATE

13. În testul de comparare interlaboratoare a metodei realizat de ISO (17), s-au obținut următoarele rezultate la utilizarea condițiilor recomandate, incluzând 20 mg C substanță chimică testată/l.

Substanță chimică testată:	Procent mediu de biodegradare (28 de zile)	Coeficient de variație (%)	Număr de laboratoare
Anilină	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

Variabilitatea în interiorul testului (reproductibilitatea), folosind anilină, a fost redusă, cu coeficienți de variabilitate care nu au depășit 5 % în aproape toate testele. În două cazuri în care reproductibilitatea a fost ceva mai redusă, este posibil ca variabilitatea mai mare să se fi datorat producției mari de CA în probele martor. Reproductibilitatea a fost ceva mai redusă cu 1-octanol, însă aceasta s-a situat totuși sub 10 % pentru 79 % din teste. Această variabilitate în interiorul testului este posibil să se datoreze erorilor de dozare, întrucât a trebuit injectat un volum mic de 1-octanol (3-4 µl) în vasele de testare închise ermetic. Coeficienți de variație mai mari ar trebui să rezulte când sunt utilizate concentrații mai scăzute de substanță chimică testată, în special la concentrații sub 10 mg C/l. Această problemă ar putea fi depășită parțial prin reducerea concentrației carbonului anorganic total (CAT) din proba de inocul.

▼M4

14. Într-un test de comparare interlaboratoare realizat în UE (24) pentru cinci agenți tensioactivi adăugați cu concentrația de 10 mg C/l, s-au obținut următoarele rezultate:

Substanță chimică testată:	Procent mediu de biodegradare (28 de zile)	Coeficient de variație (%)	Număr de laboratoare
Tetra-propilen benzen sulfonat	17	45	10
Di-izo-octilsulfo-succinat (anionic)	72	22	9
Clorura de hexadecil-trimetil amoniu (*) (cationic)	75	13	10
Izo-nonilfenol -(eto-xilat)$_9$ (neionic)	41	32	10
Coco-amido-propil dimetilhidroxi sulfobetainã (amfoter)	60	23	11

(*) Pentru neutralizarea toxicității a fost adăugat SiO_2.

Rezultatele indică faptul că, în general, variabilitatea a fost mai mare pentru agenții tensioactivi mai puțin degradați. Variabilitatea în interiorul testului a fost sub 15 % pentru aproximativ 90 % din cazuri, cea mai mare atingând 30-40 %.

Notă: Majoritatea agenților tensioactivi nu sunt specii moleculare unice, ci sunt amestecuri de izomeri, omologi etc. care se degradează după perioade de latență caracteristice diferite și cu cinetici diferite având ca rezultat curbe „neclare”, atenuate astfel încât este posibil ca valoarea pragului de 60 % să nu poată fi atinsă în „fereastra de 10 zile”, chiar dacă fiecare specie moleculară, considerată individual, ar atinge > 60 % în intervalul de 10 zile dacă ar fi testată individual. Acest fenomen poate fi observat și în cazul altor amestecuri complexe.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

15. Aparatură obișnuită de laborator și:

(a) flacoane serologice din sticlă, închise ermetic cu dopuri de cauciuc butilic și capsule din aluminiu sertizate. Mărimea recomandată este de „125 ml”, care are un volum total de aproximativ 160 ml (în acest caz, volumul fiecărui flacon ar trebui să fie cunoscut ca având 160 ± 1 ml). Poate fi utilizat un flacon de dimensiuni mai mici atunci când rezultatele se conformează condițiilor descrise la punctele 66 și 67;

(b) analizor de carbon sau un alt instrument (de exemplu, cromatograf în fază gazoasă) pentru măsurarea carbonului anorganic;

▼M4

(c) seringi de precizie înaltă pentru probe gazoase sau lichide;

(d) agitator orbital într-un mediu cu temperatură controlată;

(e) o sursă de aer fără CO_2 – acesta poate fi preparat prin trecerea aerului prin granule de oxid de calciu sodat sau prin utilizarea unui amestec de gaz 80 % N_2/20 % O_2 (opțional) (a se vedea punctul 28);

(f) dispozitiv de filtrare cu membrană cu porozitatea de 0,20-0,45 μm (opțional);

(g) analizor de carbon organic (opțional).

Reactivi chimici

16. Se utilizează întotdeauna reactivi chimici cu puritate analitică.

Apă

17. Ar trebui să se utilizeze apă distilată sau deionizată care conține ≤ 1 mg/l carbon organic total. Acesta reprezintă ≤ 5 % din conținutul de carbon organic inițial introdus prin doza recomandată a substanței chimice testate.

Soluții stoc pentru mediul cu săruri minerale

18. Soluțiile stoc și mediul cu săruri minerale sunt similare celor din ISO 14593 (16) și C.4 teste de „biodegradabilitate rapidă” (20). Utilizarea unei concentrații mai mari de clorură de amoniu (2,0 g/l în loc de 0,5 g/l) ar trebui să fie necesară numai în cazuri excepționale, de exemplu, când concentrația substanței chimice testate este > 40 mg C/l. Soluțiile stoc ar trebui păstrate la rece și eliminate după șase luni sau mai devreme dacă există dovezi de precipitare sau de proliferare microbiană. Se prepară următoarele șase soluții stoc:

(a) Fosfat diacid de potasiu (KH_2PO4) 8,50 g

Fosfat acid de potasiu (K_2HPO4) 21,75 g

Fosfat acid de sodiu dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Clorură de amoniu (NH_4Cl) 0,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru. pH-ul acestei soluții este 7,4 (± 0,2). În caz contrar, se prepară o nouă soluție.

(b) Clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

(c) Sulfat de magneziu heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru.

(d) Clorură de fier (III) hexahidrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Se dizolvă în apă și se completează până la 1 litru și se adaugă o picătură de HCl concentrat.

Prepararea mediului mineral

19. Se amestecă 10 ml de soluție (a) cu aproximativ 800 ml apă (punctul 17), apoi se adaugă câte 1 ml din soluțiile (b), (c) și (d) și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 17).

Alți reactivi chimici

20. Acid fosforic concentrat (H_3PO4) (> 85 % masă pe volum).

▼M4

Soluție de hidroxid de sodiu 7M

21. Se dizolvă 280 g hidroxid de sodiu (NaOH) într-un litru de apă (punctul 17). Se determină concentrația CAD a acestei soluții și se consideră această valoare când se calculează rezultatul testului (a se vedea punctele 55 și 61), ținând cont mai ales de criteriul de validitate de la punctul 66 litera (b). În cazul în care concentrația CAD este prea mare, se prepară o soluție proaspătă.

Substanța chimică testată

22. Se prepară o soluție stoc cu o substanță chimică testată suficient de hidrosolubilă, în apă (punctul 17) sau în mediul de testare (punctul 19), la o concentrație de preferat de 100 de ori mai mare decât a concentrației finale care urmează a fi utilizată în test; poate fi necesară ajustarea pH-ului soluției stoc. Soluția stoc se adaugă mediului mineral pentru a atinge o concentrație finală a carbonului organic cuprinsă între 2 și 40 mg C/l, de preferat 20 mg C/l. Dacă sunt utilizate concentrații mai scăzute decât acestea, poate fi afectată precizia. Substanțele chimice lichide solubile și insolubile pot fi adăugate în vase direct utilizând seringi de înaltă precizie. Este posibil ca substanțele chimice testate cu solubilitate redusă sau cele insolubile să necesite un tratament special (25). Posibilitățile sunt:

(a) adăugarea directă a unor cantități cântărite cunoscute;

(b) dispersia ultrasonică înainte de adăugare;

(c) poate fi necesară dispersia cu ajutorul agenților de emulsionare, înainte de adăugare, pentru a stabili dacă aceștia au efecte de inhibare sau de stimulare asupra activității microbiene;

(d) adsorbția substanțelor chimice testate lichide sau a unei soluții într-un solvent volatil adecvat pe un mediu sau pe un suport inert (de exemplu, filtru din fibre de sticlă), urmată de evaporarea solventului, dacă se utilizează, și adăugarea directă a unor cantități cunoscute;

(e) adăugarea unui volum cunoscut de soluție a substanței chimice testate într-un solvent ușor volatil într-un vas de testare gol, urmată de evaporarea solventului.

Agenții sau solvenții utilizați la (c), (d) și (e) trebuie testați pentru orice efect de stimulare sau inhibare a activității microbiene [a se vedea punctul 42 litera (b)].

Substanța chimică de referință

23. Se prepară o soluție stoc din substanța chimică de referință (solubilă), în apă (punctul 17), la o concentrație de preferat de 100 de ori mai mare decât concentrația finală (20 mg C/l) care urmează a fi utilizată în test.

Verificarea efectului inhibitor

24. Deseori, substanțele chimice testate nu prezintă o degradare semnificativă în condițiile utilizate pentru evaluările biodegradării rapide. Una dintre cauzele posibile este că substanța chimică testată manifestă un efect inhibitor pentru inocul la concentrația la care este aplicată în test. O verificare a efectului inhibitor poate fi inclusă în elaborarea testului pentru a ușura identificarea (retrospectivă) acestuia ca una dintre cauzele posibile sau ca factor care contribuie la aceasta. Ca alternativă, verificarea efectului inhibitor poate elimina aceste interferențe și poate demonstra că degradarea redusă sau egală cu zero este atribuibilă numai incapacității atacului microbian în condițiile de testare. Pentru a obține informații cu privire la toxicitatea substanței chimice testate asupra microorganismelor (aerobe), se prepară o soluție care conține substanța chimică testată și produsul de referință în mediul de testare (punctul 19), fiecare având aceeași concentrație ca cea pe care a avut-o la adăugarea în mediul de testare în timpul testului (a se vedea punctele 22 și 23).

▼M4

Inocul

25. Inoculul poate proveni din diferite surse: nămol activ; efluenți de ape uzate (necloruraţi), ape de suprafață și soluri sau dintr-un amestec al acestora (20). Activitatea de biodegradare a sursei ar trebui verificată folosind o substanță chimică de referință. Indiferent de sursă, microorganismele expuse anterior la substanța chimică testată nu ar trebui folosite dacă procedura urmează a se utiliza ca test pentru biodegradabilitatea rapidă.

Avertizare: Nămolul activ, apa uzată și efluentul de apă uzată conțin organisme patogene și trebuie manipulate cu precauție.

26. S-a constatat empiric că volumul optim pentru inocul este cel care:

— este suficient pentru a oferi activitate de biodegradare adecvată;

— degradează substanța chimică de referință cu procentul prevăzut (a se vedea punctul 66);

— furnizează 102-105 unități formatoare colonii pe mililitru în amestecul final;

— în mod normal, furnizează o concentrație de 4 mg/l materii solide în suspensie în amestecul final atunci când se utilizează nămol activ, pot fi utilizate concentrații de până la 30 mg/l însă pot crește semnificativ generarea de CO_2 a probelor martor (26);

— contribuie cu mai puțin de 10 % la concentrația inițială a carbonului organic introdus de substanța chimică testată;

— reprezintă, în general, 1-10 ml de inocul la 1 litru de soluție experimentală.

Nămol activ

27. Se prelevează o probă de nămol activ proaspăt din vasul de aerare al unei instalații de tratare a apelor uzate sau dintr-o instalație de laborator care tratează în special ape uzate menajere. Dacă este necesar, particulele grosiere ar trebui îndepărtate prin cernere (de exemplu, utilizând o sită cu ochiuri de 1 mm2), iar nămolul ar trebui ținut în condiții aerobe până la utilizare.

28. Alternativ, după îndepărtarea oricăror particule grosiere, se lasă la decantat sau se centrifughează (de exemplu, 1 100 × g timp de 10 minute). Se îndepărtează lichidul supernatant. Nămolul poate fi spălat în soluție minerală. Se prepară o suspensie de nămol concentrat în mediu mineral pentru a obține o concentrație de 3-5 g solide în suspensie/l. După aceea se aerează până în momentul folosirii.

29. Nămolul ar trebui prelevat dintr-o instalație de tratare clasică, care funcționează corect. Dacă nămolul trebuie prelevat dintr-o instalație de tratare cu debit mare sau se presupune că ar conține inhibitori, acesta ar trebui spălat. După amestecarea puternică, nămolul din noua suspensie se lasă la decantat sau se centrifughează, apoi se îndepărtează lichidul supernatant; nămolul spălat se trece din nou în suspensie într-un alt volum de mediu mineral. Se repetă această procedură până când se consideră că nămolul nu mai conține substrat sau inhibitor în exces.

30. Imediat înainte de folosire, se prelevează o probă după ce nămolul este suspensionat complet sau, după caz, din nămol netratat, pentru a determina greutatea uscată a solidelor în suspensie.

31. O altă alternativă constă în omogenizarea nămolului activ (3-5 g solide în suspensie/l). Se tratează nămolul într-un amestecător Waring timp de 2 minute la viteză medie. Se lasă apoi timp de 30 de minute, sau mai mult dacă este nevoie, la decantat și se prelevează lichidul pentru a fi folosit ca inocul într-un raport de aproximativ 10 ml/l de mediu mineral.

▼M4

32. Se poate obține o reducere suplimentară a degajării de CO_2 prin aerarea nămolului peste noapte cu aer fără CO_2. În acest test, pentru concentrația inoculului se utilizează 4 mg/l materii solide în nămolul activ (13).

Efluenți secundari de ape uzate

33. Alternativ, inoculul se poate obține din efluentul secundar al unei instalații de tratare sau al unei instalații de laborator care se alimentează în special cu apă uzată menajeră. Proba se menține în condiții aerobe și se folosește în ziua în care este colectată sau precondiționată, dacă este necesar. Efluentul ar trebui filtrat printr-un filtru grosier pentru a îndepărta particulele mari și se măsoară valoarea pH-ului.

34. Pentru a reduce conținutul de CA, filtratul se barbotează cu aer fără CO_2 [punctul 15 litera (e)] timp de 1 h, în timp ce pH-ul se menține la 6,5 folosind acid fosforic (punctul 20). Se aduce valoarea pH-ului la valoarea inițială cu hidroxid de sodiu (punctul 21) și, după decantarea timp de aproximativ 1 h, se prelevează un volum adecvat de supernatant pentru inoculare. Procedura de barbotare reduce conținutul de CA al inoculului. De exemplu, când s-a utilizat ca inocul volumul maxim recomandat de efluent barbotat și filtrat (100 ml) pe litru, cantitatea de CA prezentă în vasele cu probă martor s-a situat în intervalul 0,4-1,3 mg/l (14), ceea ce reprezintă 2-6,5 % din C substanței chimice testate la 20 mg C/l și 4-13 % la 10 mg C/l.

Ape de suprafață

35. Se prelevează o probă dintr-o apă de suprafață adecvată. Aceasta ar trebui ținută în condiții aerobe și utilizată în ziua în care este colectată. Dacă este necesar, proba ar trebui concentrată prin filtrare sau centrifugare. Volumul de inocul care urmează a fi utilizat în fiecare vas de testare ar trebui să îndeplinească criteriile de la punctul 26.

Soluri

36. Se prelevează o probă de sol adecvat, colectată de la o adâncime de până la 20 cm sub suprafața solului. Din proba de sol ar trebui îndepărtate pietrele, resturile de plante și nevertebratele înainte ca aceasta să fie cernută printr-o sită cu ochiuri de 2 mm (dacă proba este prea umedă pentru a fi cernută imediat, se usucă parțial cu aer pentru a ușura cernerea). Proba ar trebui ținută în condiții aerobe și utilizată în ziua colectării (dacă proba este transportată într-o pungă neagră de polietilenă care nu se închide ermetic, poate fi păstrată în pungă, la 2-4 °C, timp de o lună).

Precondiționarea inoculului

37. Inoculul poate fi precondiționat și adus în condițiile de testare, dar nu și preadaptat la substanța chimică testată. Precondiționarea poate reduce degajarea de CO_2 a probei martor. Precondiționarea constă în aerarea nămolului activ după diluarea în mediul de testare la 30 mg/l, cu aer umed fără CO_2, timp de până la 5-7 zile, la temperatura de testare.

PROCEDURA DE TESTARE

Număr de sticle

38. Numărul de flacoane [punctul 15 litera (a)] necesar pentru un test va depinde de frecvența analizei și de durata testului.

39. Se recomandă analizarea a trei seturi de flacoane, după un număr suficient de intervale de timp astfel încât să poată fi identificată fereastra de 10 zile. De asemenea, la finalul testului se analizează cel puțin cinci flacoane de testare [punctul 15 litera (a)] din seturile (a), (b) și (c) (a se vedea punctul 42), pentru a putea calcula intervalele de încredere 95 % pentru valoarea procentuală medie a biodegradării.

▼**M4**

Mediu inoculat

40. Inoculul se utilizează la o concentrație de 4 mg/l solide uscate în nămolul activat. Imediat înainte de utilizare se prepară suficient mediu inoculat prin adăugarea, de exemplu, a 2 ml de nămol activ, tratat în mod adecvat (punctele 27-32), la o concentrație de 2 000 mg/l la 1 litru de mediu cu săruri minerale (punctul 19). Când urmează a se utiliza efluenți secundari de ape uzate, se adaugă până la 100 ml de efluent (punctul 33) la 900 ml mediu cu săruri minerale (punctul 19) și se diluează până la 1 litru cu mediu.

Pregătirea flacoanelor

41. Se dozează alicote din mediu în flacoane duplicat pentru a se obține un raport spațiu liber-lichid de 1:2 (de exemplu, se adaugă 107 ml în flacoane cu capacitatea de 160 ml). Pot fi utilizate alte rapoarte, dar se ține cont de avertismentul de la punctul 11. Când se utilizează oricare dintre tipurile de inocul, trebuie avut grijă să se asigure că mediul inoculat este amestecat corespunzător pentru a se asigura distribuția uniformă în vasele de testare.

42. Seturile de flacoane [punctul 15 litera (a)] sunt preparate pentru a conține următoarele:

(a) vase de testare (notate F_T) care conțin substanța chimică testată;

(b) vase martor (notate F_B) care conțin numai mediul de testare și inoculul; trebuie adăugate, de asemenea, orice substanțe chimice, solvenți, agenți sau filtre din fibră de sticlă utilizate pentru a introduce substanța chimică testată în vasele de testare;

(c) vase pentru procedura de verificare (notate F_C), care conțin substanța chimică de referință;

(d) dacă este necesar, vase pentru verificarea posibilului efect inhibitor al substanței chimice testate (notate F_I), care conțin atât substanța chimică testată, cât și substanța chimică de referință, la aceleași concentrații (punctul 24) cu cele din vasele F_T și F_C;

(e) vase pentru verificarea unei posibile degradări abiotice (notate F_S), care sunt vasele de la litera (a) în care se adaugă 50 mg/l $HgCl_2$ sau sunt sterilizate prin alte metode (de exemplu, prin autoclavare).

43. Substanțele chimice testate solubile în apă și substanțele chimice de referință se adaugă la soluțiile stoc apoase (punctele 22, 23 și 24) pentru a obține o concentrație de 10-20 mg C/l.

44. Substanțele chimice testate insolubile și substanțele chimice de referință insolubile se adaugă în flacoane prin diferite metode [a se vedea punctul 22 literele (a)-(e)], în funcție de natura substanței chimice testate, fie înainte, fie după adăugarea mediului inoculat, în funcție de metoda de tratare a substanței chimice testate. Dacă se utilizează una dintre procedurile prezentate la punctul 22 literele (a)-(e), atunci flacoanele cu probă martor F_B [punctul 42 litera (b)] ar trebui tratate într-un mod similar, excluzându-se însă substanța chimică testată sau substanța chimică de referință.

45. Substanțele chimice testate volatile ar trebui injectate în flacoane închise ermetic (punctul 47) folosind o microseringă. Doza se calculează în funcție de volumul injectat și de densitatea substanței chimice testate.

46. În vase ar trebui adăugată apă, dacă este necesar, pentru a obține același volum de lichid în fiecare vas. Trebuie să se asigure că raportul spațiu liber-lichid (de obicei 1:2) și concentrațiile substanței chimice testate sunt astfel încât în spațiul liber se află suficient oxigen pentru a permite biodegradarea completă.

▼M4

47. Apoi toate flacoanele se închid ermetic, de exemplu, cu membrană de cauciuc butilic și capace de aluminiu. În acest stadiu ar trebui adăugate substanțele chimice testate volatile (punctul 45). Dacă urmează a fi monitorizată scăderea concentrației COD a soluției experimentale și dacă urmează a se efectua analize ale concentrației inițiale de CA la momentul zero [etaloane sterile, punctul 42 litera (e)] sau ale alor parametri, se prelevează o probă adecvată din vasul de testare. Vasul de testare și conținutul acestuia sunt apoi eliminate.

48. Flacoanele închise ermetic se pun într-un agitator rotativ [punctul 15 litera (d)], cu o viteză de agitare suficientă pentru a menține conținutul flaconului bine amestecat și în suspensie (de exemplu, 150-200 rpm) și se incubează la întuneric, la 20 °C, pentru a se menține o variație de ± 1 °C.

Prelevarea de probe

49. Tipul de prelevare va depinde de perioada de latență și de cinetica biodegradării substanței chimice testate. Flacoanele se scot definitiv pentru analiză în ziua prelevării probei, ceea ce ar trebui să se producă săptămânal sau mai des (de exemplu, de două ori pe săptămână) dacă se cere o curbă de degradare completă. Din agitator se scoate numărul cerut de flacoane duplicat, acestea fiind F_T, F_B și F_C și, dacă au fost folosite, F_I și F_S (a se vedea punctul 42). Testul durează de obicei 28 de zile. În cazul în care curba de biodegradare indică faptul că a fost atins un platou înainte de 28 de zile, testul poate fi încheiat înainte de 28 de zile. Se prelevează probe din cele cinci flacoane rezervate analizei în ziua 28 a testului, iar rezultatele se utilizează pentru calcularea limitelor de încredere sau a coeficientului de variație a procentului de biodegradare. Din flacoanele destinate verificărilor inhibării și degradării abiotice nu trebuie prelevate probe atât de des ca în cazul celorlalte vase; ar fi suficiente prelevări în ziua 1 și în ziua 28.

Analiza carbonului anorganic (CA)

50. Generarea de CO_2 în flacoane se determină prin măsurarea creșterii concentrației de carbon anorganic (CA) în timpul incubării. Sunt disponibile două metode recomandate pentru măsurarea cantității de CA generat în cadrul testului, iar acestea sunt descrise mai jos. Deoarece metodele pot genera rezultate ușor diferite, se recomandă utilizarea unei singure metode în timpul unui test.

51. Metoda (a) este recomandată dacă este probabil ca mediul să conțină, de exemplu, resturi de hârtie de la filtrul de sticlă și/sau de substanță chimică testată insolubilă. Această analiză poate fi realizată folosind un cromatograf în fază gazoasă, dacă nu este disponibil un analizor de carbon. Este important ca, atunci când se analizează gazul din spațiul liber, flacoanele să fie la temperatura de testare sau la o temperatură apropiată de aceasta. Metoda (b) se poate dovedi mai ușor de folosit în laboratoarele care măsoară CA folosind analizoare de carbon. Este important ca soluția de hidroxid de sodiu (punctul 21) folosită pentru a transforma CO_2 în carbonat să fie preparată proaspăt sau conținutul de CA al acesteia să fie cunoscut, astfel încât acesta să poată fi avut în vedere la calcularea rezultatelor testului [a se vedea punctul 66 litera (b)].

Metoda (a): acidificarea la pH < 3

52. Înaintea fiecărei serii de analize, analizorul de CA se calibrează folosind un standard pentru CA adecvat (de exemplu, 1 % g/g CO_2 în N2). Acidul fosforic (punctul 20) se injectează prin dopul fiecărui flacon din care se prelevează probe pentru a reduce pH-ul mediului la < 3 (de exemplu, se adaugă 1 ml la 107 ml mediu de testare). Flacoanele sunt puse înapoi în agitator. După agitarea timp de o oră la temperatura de testare, flacoanele sunt scoase din agitator, sunt extrase alicote de gaz (de exemplu, 1 ml) din spațiul liber al fiecărui flacon și sunt injectate în analizorul de CA. Concentrațiile de CA măsurate sunt înregistrate în mg C/l.

▼M4

53. Această metodă are la bază principiul conform căruia, după acidificarea la pH < 3 și echilibrarea la 20 °C, constanta de echilibru pentru distribuția CO_2 între fazele lichidă și gazoasă din flacoanele de testare este 1,0 când se măsoară sub forma concentrației (13). Această relație ar trebui demonstrată pentru sistemul de testare cel puțin o dată după cum urmează:

Se pregătesc flacoane care conțin 5 și 10 mg/l de CA folosind o soluție de carbonat de sodiu anhidru (Na_2CO3) în apă fără CO_2 preparată prin acidificarea apei la pH 6,5 cu acid fosforic concentrat (punctul 20), barbotarea peste noapte cu apă fără CO_2 și aducerea pH-ului la valoarea neutră cu o substanță alcalină. Se asigură că raportul dintre volumul spațiului liber și volumul lichidului este același cu cel din cadrul testelor (de exemplu, 1:2). Se acidifică și se echilibrează conform descrierii de la punctul 52 și se măsoară concentrațiile de CA atât în faza din spațiul liber, cât și în faza lichidă. Se verifică faptul că cele două concentrații sunt identice, în intervalul de eroare experimentală. Dacă nu este așa, operatorul ar trebui să reexamineze procedurile. Această verificare a distribuției CA între fazele lichidă și gazoasă nu trebuie realizată ori de câte ori se efectuează un test; aceasta ar putea fi realizată în timpul efectuării calibrării.

54. Dacă urmează a se măsura eliminarea COD (numai pentru substanțe chimice testate solubile în apă), ar trebui să se ia probe din faza lichidă din flacoane separate (neacidificate), filtrate prin membrană și injectate în analizorul de COD. Aceste flacoane pot fi folosite pentru alte analize, dacă este necesar, pentru a măsura biodegradarea primară.

Metoda (b): transformarea CO_2 în carbonat

55. Înainte de analizarea fiecărei serii, analizorul de CA se calibrează folosind un standard adecvat – de exemplu, o soluție de bicarbonat de sodiu ($NaHCO_3$) în apă fără CO_2 (a se vedea punctul 53) în intervalul 0-20 mg/l CA. Soluția de hidroxid de sodiu (7M, punctul 21) (de exemplu, 1 ml la 107 ml de mediu) se injectează prin dopul fiecărui flacon folosit pentru prelevare, iar flacoanele sunt agitate timp de 1 h la temperatura de testare. Se folosește aceeași soluție de NaOH în toate flacoanele scoase definitiv într-o anumită zi, însă nu este necesar pentru toate prelevările de probe realizate pe parcursul unui test. Dacă se cer valorile CA absolute ale probei martor la fiecare prelevare de probe, va fi necesară determinarea CA din soluția de NaOH de fiecare dată când aceasta este folosită. Flacoanele sunt scoase din agitator și sunt lăsate să decanteze. Sunt prelevate volume adecvate (de exemplu, 50-1 000 µl) din faza lichidă din fiecare vas cu ajutorul unei seringi. Probele sunt injectate în analizorul de CA și sunt înregistrate concentrațiile de CA. Ar trebui să se asigure faptul că analizorul utilizat este dotat corespunzător pentru a trata probele alcaline produse prin această metodă.

56. Această metodă are la bază principiul conform căruia, după adăugarea de produs alcalin și agitare, concentrația de CA în spațiul liber este neglijabilă. Această relație ar trebui verificată pentru sistemul testat cel puțin o dată folosind standarde pentru CA, adăugând produse alcaline și echilibrând și măsurând concentrația de CA atât în faza din spațiul liber, cât și în faza lichidă (a se vedea punctul 53). Concentrația în spațiul liber ar trebui să fie apropiată de zero. Această verificare a absorbției practic complete a CO_2 nu trebuie realizată de fiecare dată când se efectuează testul.

57. Dacă urmează a se măsura eliminarea COD (numai pentru substanțe chimice testate solubile în apă), ar trebui prelevate probe din faza lichidă din flacoane separate (care nu conțin produs alcalin), filtrate prin membrană și injectate în analizorul de COD. Aceste flacoane pot fi folosite pentru alte analize, dacă este necesar, pentru a măsura biodegradabilitatea primară.

▼M4

DATE ȘI RAPORT

Calcularea rezultatelor

58. Presupunând că substanța chimică testată este mineralizată 100 % la CO_2, CATh care o depășește pe cea generată în flaconul cu probă martor este egală cu COT adăugată în fiecare flacon de testare la începutul testului, adică:

$$CATh = COT$$

Masa totală (mg) de carbon anorganic (CAT) din fiecare flacon este:

$$TIC = (\text{mg C din lichid} + \text{mg C din spațiul liber}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ecuația [1]}$$

unde:

V_L = volumul de lichid din vas (litri);

CL = concentrația de CA în lichid (carbon în mg/l);

VH = volumul spațiului liber (litri);

CH = concentrația de CA în spațiul liber (carbon în mg/l).

Calculele CAT prin cele două metode analitice folosite pentru măsurarea CA în acest test sunt descrise mai jos la punctele 60 și 61. Procentul de biodegradare (*% D*) din fiecare caz este dat de:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ecuația [2]}$$

unde:

CAT_t = mg CAT din flaconul de testare la momentul t

CAT_b = mg CAT din flacoanele cu probă martor la momentul t

COT = mg COT adăugate inițial în flaconul de testare

Procentul de biodegradare % D se calculează pentru flacoanele de testare (F_T), de referință (F_C) și, dacă este inclus, de verificare a monitorizării efectului inhibitor (F_I) în funcție de cantitățile respective de CAT generate până la momentul fiecărei prelevări de probe.

59. Dacă s-a produs o creștere semnificativă a conținutului de CAT în etalonul steril (F_S) în timpul testului, atunci se poate concluziona că a avut loc degradarea abiotică a substanței chimice testate și trebuie să se țină cont de aceasta la calcularea D din ecuația [2].

Acidificare la pH < 3

60. Deoarece acidificarea la pH < 3 și echilibrarea au ca rezultat egalizarea concentrației de CAT în fazele lichidă și gazoasă, trebuie măsurată numai concentrația de CA din faza gazoasă. Astfel, din Ecuația [1] $CAT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, unde V_B = volumul flaconului serologic.

Transformarea CO_2 în carbonat

61. În această metodă calculele se efectuează la fel ca în ecuația [1], însă cantitatea neglijabilă de CA din faza gazoasă este ignorată, adică $V_H \times C_H = 0$ și $CAT = V_L \times C_L$.

▼M4

Exprimarea rezultatelor

62. Prin unirea procentelor de biodegradare se obține o curbă de biodegradare, D, în funcție de timpul de incubare, iar aceasta va indica, dacă este posibil, faza de latență, faza de biodegradare, fereastra de 10 zile și faza de platou, care este faza în care s-a atins degradarea maximă și curba de biodegradare este nivelată. Dacă au fost obținute rezultate comparabile pentru vasele de testare paralele F_T (diferență < 20 %), se trasează o curbă medie (a se vedea apendicele 2, figura 1); în caz contrar, se trasează curbe pentru fiecare vas. Se determină valoarea medie a procentului de biodegradare în faza de platou sau se evaluează valoarea cea mai mare a acesteia (de exemplu, când curba descrește în faza de platou), este important însă să se estimeze că, în acest din urmă caz, valoarea nu este divergentă. Acest nivel maxim al biodegradării este indicat în raportul testului ca „grad de biodegradare al substanței chimice testate”. Dacă numărul de vase de testare a fost insuficient pentru indicarea fazei de platou, datele măsurate din ultima zi a testului sunt folosite pentru calcularea unei valori medii. Această valoare finală, media a cinci teste duplicat, servește la indicarea preciziei cu care a fost determinat procentul de biodegradare. Se raportează, de asemenea, valoarea obținută la finalul ferestrei de 10 zile.

63. În același mod, se trasează o curbă pentru substanța chimică de referință F_C și, dacă acestea sunt incluse, pentru verificarea degradării abiotice F_S și pentru verificarea efectului inhibitor F_I.

64. Cantitățile de CAT prezente în probele martor (F_B) sunt înregistrate la fel cum sunt înregistrate și cele din flacoanele F_S (verificare abiotică), dacă aceste vase au fost incluse în test.

65. Se calculează D pentru vasele F_I, pe baza unui randament teoretic preconizat pentru CA numai din componentul de referință al amestecului. Dacă, în ziua 28, $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2)/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, se poate presupune că substanța chimică testată a inhibat activitatea inoculului, iar acest fapt poate fi responsabil pentru valorile mici obținute pentru D_{FT} în condițiile de testare. În acest caz, testul poate fi repetat folosind o concentrație mai mică a substanței testate și, de preferat, cu reducerea CID din inocul și a CAT format în probele martor, întrucât concentrația mai scăzută va reduce precizia metodei. Ca alternativă, poate fi utilizat un alt inocul. Dacă în flaconul F_S (abiotic) se observă o creștere semnificativă (> 10 %) a cantității de CAT, este posibil ca procesele de degradare abiotică să fi avut loc.

Validarea rezultatelor

▼M7

66. Un test este considerat valid în cazul în care:

a) valoarea procentuală medie de degradare din vasele F_C care conțin substanța chimică de referință este > 60 % în a 14-a zi de incubare; și

b) cantitatea medie de CAT prezent în probele martor alb F_B la finalul testului este < 3 mg C/l.

În cazul în care aceste limite nu sunt satisfăcute, se repetă testul cu un inocul din altă sursă și/sau se revizuiesc procedurile utilizate De exemplu, în cazul în care producția CI martor alb ridicată reprezintă o problemă, se urmărește procedura descrisă la punctele 27-32.

(1) Procentul de degradare din vasele F_C care conțin substanța de referință.
(2) Procentul de degradare din vasele F_I.

▼M4

67. Dacă substanța chimică testată nu atinge 60 % CATh și s-a dovedit că nu are efect inhibitor (punctul 65), testul ar putea fi repetat cu o concentrație mai mare de inocul (până la 30 mg/l nămol activ și 100 ml efluent/l) sau cu inocul din alte surse, în special dacă degradarea s-a situat în intervalul 20-60 %.

Interpretarea rezultatelor

68. Biodegradarea CATh > 60 % în intervalul ferestrei de 10 zile din acest test demonstrează că substanța chimică testată este ușor biodegradabilă în condiții aerobe.

69. Dacă valoarea de prag de 60 % a CATh nu a fost atinsă, se determină valoarea pH-ului mediului din flacoanele care nu au fost acidificate sau alcalinizate; o valoare mai mică de 6,5 ar putea indica faptul că s-a produs nitrificarea. În acest caz, se repetă testul cu o soluție tampon cu o concentrație mai mare.

Raportul de testare

70. Se întocmește un tabel cu % D pentru fiecare flacon de testare (F_T), de referință (F_C) și, dacă este inclus, pentru flaconul de verificare a efectului inhibitor (F_I), pentru fiecare dintre zilele în care s-au prelevat probe. Dacă s-au obținut rezultate comparabile pentru flacoane duplicat, se trasează o curbă a % D medie în funcție de timp. Se înregistrează cantitatea de CAT în probele martor (F_B) și în etaloanele sterile (F_S), COD și/sau alți parametri, precum și procentajul de eliminare al acestora.

71. Se determină valoarea medie a % D din faza de platou sau se folosește valoarea cea mai mare în cazul în care curba de biodegradare descrește în faza de platou, iar această valoare se raportează ca „grad de biodegradare al substanței chimice testate”. În acest din urmă caz, este important să se asigure că valoarea nu este divergentă.

72. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică testată:

— denumire comună, denumire chimică, număr CAS, formulă structurală și proprietăți fizico-chimice relevante;

— puritatea (impuritățile) substanței chimice testate.

Condițiile de testare:

— trimiterea la prezenta metodă de testare;

— descrierea sistemului de testare utilizat (de exemplu, volumul vasului, raportul spațiu liber/lichid, metoda de amestecare etc.);

— adăugarea substanței chimice testate în sistemul de testare: concentrația substanței testate și cantitatea de carbon dozată în fiecare flacon de testare și orice utilizare a solvenților;

— detalii privind inoculul utilizat, orice pretratare și precondiționare;

— temperatura de incubare;

— validarea principiului analizei CA;

— principalele caracteristici ale analizorului de CA utilizat (și ale oricăror ale metode analitice utilizate);

— numărul de flacoane duplicat.

Rezultatele:

— datele primare și valorile calculate ale biodegradabilității în formă tabelară;

▼M4

— graficul degradării procentuale în funcție de timp pentru substanța chimică testată și pentru substanța chimică de referință, faza de latență, faza de degradare, fereastra de 10 zile și panta;

— procentul de eliminare la platou, la finalul testului și după fereastra de 10 zile;

— motivele de respingere a rezultatelor testului;

— orice alte fapte relevante pentru procedura urmată;

— discutarea rezultatelor.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» – Test de degajare a CO_2 (Metoda C.4-C)”.

(2) Sturm R.N. (1973), Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation, J.A., Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979), Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A. și Bookland E.A. (1996), Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revizuit în 1999), Calitatea apei – Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Testul degajării dioxidului de carbon (Sturm).

(6) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996), Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975), Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate, Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994), The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability, Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975), A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides, J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978), Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986), A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990), Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test, Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991), The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability, Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989), Screening of chemicals for anaerobic biodegradation, Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999), Calitatea apei – Evaluarea în mediu apos a biodegradabilității aerobe ultime a compușilor organici. Metoda prin analiza carbonului anorganic în vase închise ermetic (Încercare cu CO_2 în spațiul superior).

(17) Battersby N.S. (1997), The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996), Fate, Transport and Transportation. 835,3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999), An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test, Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Capitolul C.4 din prezenta anexă, „Determinarea biodegradabilității «rapide» ".

(21) OCDE (1988), OCDE Metode de testare comparate interlaboratoare pentru determinarea biodegradabilității rapide: Raportul președintelui (M. Hashimoto; MITI) și raportul final (M. Kitano și M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Capitolul C.11 din prezenta anexă, „Nămolul activ: test de inhibiție a respirației".

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995), A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests, Biodegradation 6: 319-327.

(24) UE (1999), Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996), Calitatea apei. Ghid pentru pregătirea și tratarea compușilor organici greu solubili în apă în vederea evaluării biodegradabilității lor în mediu apos.

▼**M4**

Apendicele 1

ABREVIERI ȘI DEFINIȚII

CA: carbon anorganic.

CO_2T: cantitatea teoretică de dioxid de carbon (mg) este cantitatea de dioxid de carbon calculată din conținutul de carbon cunoscut sau măsurat al substanței chimice testate când aceasta este complet mineralizată; se exprimă și ca mg dioxid de carbon degajat pe mg substanță chimică testată.

COD: carbonul organic dizolvat este carbonul organic prezent în soluție sau acela care trece printr-un filtru de 0,45 microni sau rămâne în supernatant după centrifugare la aproximativ 4 000 g (aproximativ 40 000 m s^{-2}) timp de 15 min.

CAD: carbon anorganic dizolvat.

CATh: carbon anorganic teoretic.

CAT: carbon anorganic total.

Ușor biodegradabil: o clasificare arbitrară a substanțelor chimice care au trecut anumite teste de screening specificate pentru biodegradabilitatea finală; aceste teste sunt atât de riguroase încât se admite că asemenea substanțe chimice se vor degrada biologic rapid și complet în medii acvatice în condiții aerobe.

Fereastră de 10 zile: cele 10 zile care urmează imediat după atingerea nivelului de 10 % biodegradare.

Biodegradabilitate intrinsecă: o clasificare a substanțelor chimice pentru care există probe neechivoce de biodegradare (primară sau finală) în orice test de biodegradabilitate.

Biodegradare aerobă finală: nivelul de degradare realizat când substanța chimică testată este complet folosită de microorganisme având ca rezultat producerea de dioxid de carbon, apă, săruri minerale și noi constituenți celulari microbieni (biomasă).

Mineralizare: mineralizarea reprezintă degradarea completă a unei substanțe chimice organice în CO_2 și H_2O în condiții aerobe și în CH_4, CO_2 și H_2O în condiții anaerobe.

Fază de latență: perioada cuprinsă între începutul unui test și momentul în care se realizează aclimatizarea și/sau adaptarea microorganismelor care produc degradarea, iar gradul de biodegradare al unei substanțe chimice testate sau al materiilor organice a crescut la un nivel detectabil (de exemplu, 10 % din biodegradarea teoretică maximă sau mai puțin, în funcție de precizia metodei de măsurare).

Faza de degradare: timpul de la sfârșitul perioadei de latență până în momentul în care se atinge 90 % din nivelul maxim de degradare.

Faza de platou: faza de platou este faza în care s-a atins degradarea maximă, iar curba de biodegradare s-a aplatizat.

Substanță chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

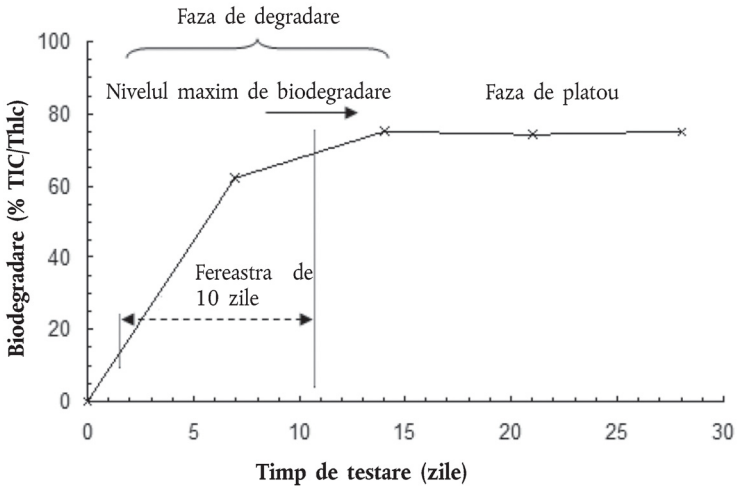
▼M4

Apendicele 2

Exemplu de curbă de biodegradare

Figura 1

Biodegradarea 1-octanolului în testul CO_2 în spațiul liber



Glosar

Biodegradare

Faza de degradare

Nivelul maxim de biodegradare

Faza de platou

Fereastra de 10 zile

Timp de testare (zile)

▼M4

C. 30. **BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE TERESTRE**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 317 (2010). Printre metodele de testare în legătură cu evoluția în mediu, „Bioconcentrarea: experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor” [capitolul C.13 din prezenta anexă (49)] și „Bioacumularea în oligochetele bentice care trăiesc în sedimente” (53) au fost publicate în anii 1996 și respectiv 2008. Este dificil, dacă nu imposibil, ca datele privind bioacumularea acvatică să fie extrapolate la organismele terestre, cum sunt râmele. În prezent, sunt utilizate modele de calcul bazate pe un test al caracterului lipofil al unei substanțe chimice, de exemplu, (14) (37), pentru evaluarea bioacumulării de substanțe chimice în sol, cum este de exemplu, Ghidul tehnic al UE (19). Necesitatea unei metode de testare care să includă compartimente specifice a fost deja prezentată, de exemplu în (55). O astfel e metodă este importantă, mai ales pentru evaluarea otrăvirii secundare în lanțurile alimentare terestre (4). Mai multe metode de testare naționale abordează problema bioacumulării în alte organisme în afară de pești, de exemplu (2) și (72). O metodă de măsurare a bioacumulării din solurile contaminate în râme (*Eisenia fetida*, Savigny) și în enchitreide a fost dezvoltată de American Society for Testing and Materials (Societatea Americană pentru Testări și Materiale) (3). O metodă acceptată pe plan internațional pentru determinarea bioacumulării în solul îmbogățit va îmbunătăți evaluarea riscurilor substanțelor chimice asupra ecosistemelor terestre, de exemplu (25) (29).

2. Nevertebratele geofage sunt expuse la substanțele chimice prezente în sol. Printre aceste animale, oligochetele terestre joacă un rol important în structura și funcția solurilor (15) (20). Oligochetele terestre trăiesc în sol și, parțial, la suprafața acestuia (în special în litieră); acestea reprezintă în mod frecvent specia cea mai abundentă din punct de vedere al biomasei (54). Prin rolul lor în bioturbația solului și ca pradă, aceste animale pot avea o influență puternică asupra biodisponibilității substanțelor chimice pentru organisme prădătoare, precum nevertebratele [de exemplu, acarieni prădători și coleoptere; de exemplu (64)] sau vertebratele (de exemplu, vulpi și pescăruși) (18) (62). Unele specii de oligochete terestre folosite în prezent în cadrul testelor ecotoxicologice sunt descrise în apendicele 5.

3. Ghidul ASTM privind efectuarea testelor de laborator pentru toxicitatea solului sau bioacumulare cu râme *Eisenia fetida* și enchitreide *Enchytraeus albidus* (3) furnizează multe detalii esențiale și utile pentru realizarea metodei de testare curente privind bioacumularea în sol. Documentația suplimentară la care se face trimitere în prezenta metodă de testare sunt disponibile în capitolul C.13 din prezenta anexă, Bioconcentrarea: experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor (49) și în orientarea nr. 315 a OCDE: Bioacumularea în oligochetele bentice care trăiesc în sedimente (53). Experiența practică obținută din studiile privind bioacumularea în sol și din diversele publicații ale literaturii de specialitate, de exemplu, (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) reprezintă, de asemenea, surse importante de informații pentru această metodă de testare.

4. Prezenta metodă de testare se aplică în general substanțelor chimice organice, neutre, stabile care tind să se adsoarbă în soluri. Prezenta metodă de testare poate permite testarea bioacumulării compușilor organo-metalici stabili prezenți în sol. De asemenea, aceasta este aplicabilă metalelor și altor microelemente.

PREMISE

5. Testele pentru măsurarea bioacumulării unei substanțe chimice în oligochetele terestre au fost efectuate cu metale grele [a se vedea, de exemplu, (63)] și cu substanțe chimice organice persistente care aveau valorile log K_{ow} cuprinse între 3,0 și 6,0, de exemplu (40). Aceste teste se aplică, de asemenea, la:

— substanțe chimice care prezintă un log K_{ow} mai mare de 6,0 (substanțe chimice super-hidrofobe);

▼M4

— substanțe chimice care aparțin clasei de substanțe chimice organice cunoscute a avea potențial de bioacumulare în organisme vii, de exemplu substanțe chimice tensioactive sau foarte adsorbante;

— substanțe chimice al căror potențial de bioacumulare este indicat de caracteristicile structurale, de exemplu analogi ai substanțelor chimice cu potențial de bioacumulare cunoscut; și

— metale.

6. Înainte de inițierea studiului ar trebui obținute informații privind substanțele chimice testate, cum sunt denumirea comună, denumirea chimică (de preferat denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea, măsurile de securitate, condițiile adecvate de păstrare și metodele analitice. În plus, trebuie cunoscute următoarele informații:

(a) solubilitatea în apă;

(b) coeficientul de partiție octanol-apă, K_{ow};

(c) coeficientul de partiție sol-apă, exprimat prin K_{oc};

(d) presiunea de vapori;

(e) degradabilitatea (de exemplu, în sol, apă);

(f) metaboliții cunoscuți.

7. Pot fi utilizate substanțe chimice de testare marcate radioactiv sau nemarcate radioactiv. Totuși, pentru a ușura analiza, se recomandă utilizarea unei substanțe chimice testate marcată radioactiv. Decizia se va lua în funcție de limitele de detectare sau de necesitatea de măsurare a substanței chimice testate de origine și a metaboliților. Dacă se utilizează o substanță chimică de testat marcată radioactiv și dacă sunt măsurate reziduurile radioactive totale, este important ca reziduurile marcate radioactiv, atât din sol, cât și din organismele testate, să fie definite în procente de substanță chimică testată de origine și de substanță chimică marcată ca nefiind de origine, de exemplu în probe prelevate la starea de echilibru sau la finalul fazei de absorbție, pentru a permite calcularea unui factor de bioacumulare (BAF) pentru substanța chimică testată de origine și pentru metaboliții din sol care prezintă interes (a se vedea punctul 50). S-ar putea dovedi necesară modificarea metodei descrise aici, de exemplu pentru a furniza suficientă biomasă pentru măsurarea substanțelor chimice testate organice sau a metalelor nemarcate radioactiv. Când sunt măsurate reziduurile radioactive totale (prin numărătoarea în scintilație lichidă după extracția, arderea sau solubilizarea țesutului), factorul de bioacumulare se bazează pe substanța chimică testate de origine și pe metaboliți. Calcularea BAF ar trebui să se bazeze, de preferat, pe concentrația substanței chimice testate de origine din organism și pe reziduurile radioactive totale. Ulterior, factorul de acumulare biotă-sol (BSAF), ajustat cu conținutul de lipide al viermelui și cu conținutul de carbon organic (CO) al solului, ar trebui calculat din BAF din motive de asigurare a comparabilității între rezultatele obținute din diferite teste de bioacumulare.

8. Toxicitatea substanței chimice testate față de speciile utilizate în test ar trebui să fie cunoscută, de exemplu, o concentrație de efect (CEx) sau concentrația letală (CLx) pentru durata fazei de absorbție [de exemplu (19)]. Concentrația selectată a substanței chimice testate ar trebui să fie, de preferat, de aproximativ 1 % din CL_{50} acută asimptotică și de cel puțin zece ori mai mare decât limita sa de detecție în sol prin metoda de analiză utilizată. Dacă sunt disponibile, ar trebui utilizate în mod preferențial valorile de toxicitate determinate din studiile de lungă durată privind efectele subletale (51) (52). Dacă aceste date nu sunt disponibile, un test privind toxicitatea acută va furniza informații utile [a se vedea, de exemplu, (23)].

▼M4

9. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică potrivită pentru care se cunosc exactitatea, fidelitatea și sensibilitatea în vederea cuantificării substanței chimice din soluțiile experimentale, din sol și din materialul biologic, împreună cu detalii privind prepararea și păstrarea probelor, precum și cu fișe tehnice de securitate. De asemenea, trebuie cunoscută limita de detecție analitică a substanței testate din sol și din țesutul viermelui. Dacă se utilizează o substanța chimică testată marcată cu C^{14}, trebuie să fie cunoscute radioactivitatea specifică (de exemplu Bq mol^{-1}) și procentul radioactivității asociate impurităților. Radioactivitatea specifică a substanței chimice testate trebuie să fie suficient de mare pentru a facilita analiza, iar concentrațiile substanței testate nu trebuie să producă efecte toxice.

10. Testul poate fi realizat cu un sol artificial sau cu soluri naturale. Înainte de inițierea testului ar trebui cunoscute informațiile privind caracteristicile solului natural utilizat, de exemplu originea solului sau constituenții acestuia, pH-ul, conținutul de carbon organic, granulometria (procent de nisip, aluviuni și argilă) și capacitatea de reținere a apei (CRA), (3) (48).

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Parametrii care caracterizează bioacumularea unei substanțe chimice testate includ factorul de bioacumulare (BAF), constanta vitezei de absorbție (k_s) și constanta vitezei de eliminare (k_e). Definițiile sunt prevăzute în apendicele 1.

12. Testul constă în două faze: faza de absorbție (expunere) și faza de eliminare (post-expunere). În timpul fazei de absorbție, grupuri replicate de viermi sunt expuse la solul care a fost îmbogățit cu substanța chimică testată. Pe lângă animalele testate, grupuri martor de viermi sunt ținute în condiții identice fără substanța chimică testată. Se măsoară greutatea uscată și conținutul de lipide ale organismelor testate. Aceasta se poate realiza folosind viermii din grupul martor. Valorile analitice de bază (martor) pot fi obținute prin analizarea probelor martor de viermi și de sol. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sol fără substanța chimică testată. O fază de eliminare este necesară întotdeauna, exceptând cazul în care absorbția substanței chimice testate în timpul fazei de expunere a fost nesemnificativă. O fază de eliminare furnizează informații privind viteza cu care substanța chimică testată este excretată de organismele testate [de exemplu (27)]. Dacă în timpul fazei de absorbție nu se atinge o stare de echilibru, este de preferat ca determinarea parametrilor cinetici – factorul de bioacumulare cinetic BAF_K, constanta (constantele) vitezei de absorbție și de eliminare – să se bazeze pe ajustarea simultană a rezultatelor fazelor de absorbție și de eliminare. Concentrația substanței chimice testate din/de pe viermi se monitorizează pe parcursul ambelor faze ale testului.

13. În timpul fazei de absorbție, măsurătorile se realizează la intervale de prelevare de până la 14 zile (la enchitreide) sau de 21 de zile (la râme) până când se atinge starea de echilibru (11) (12) (67). Starea de echilibru apare atunci când un grafic al concentrației din viermi în funcție de timp este paralel cu axa timpului, iar analizele a trei concentrații succesive realizate pe probe prelevate la intervale de cel puțin două zile nu variază cu mai mult de ± 20 % una față de cealaltă, pe baza comparațiilor statistice (de exemplu, analiza variației, analiza regresiei).

14. Faza de eliminare constă în transferul organismelor testate în vase care conțin același substrat fără substanța chimică testată. În timpul fazei de eliminare, măsurătorile se realizează la intervale de prelevare de până la 14 zile (la enchitreide) sau de 21 de zile (la râme), exceptând cazul în care o determinarea analitică anterioară a indicat o reducere cu 90 % a reziduurilor substanței chimice testate în viermi. Concentrația substanței chimice testate din viermi la finalul fazei de eliminare se raportează ca reziduuri neeliminate. Factorul de bioacumulare al stării de echilibru (BAFss) se calculează, de preferință, atât ca raport între concentrația din viermi (Ca) și cea din sol (Cs) la starea de echilibru aparentă, cât și ca factor de bioacumulare cinetic,

▼M4

BAF_K, ca raport între constanta vitezei de absorbție din sol (ks) și constanta vitezei de eliminare (ke) (a se vedea apendicele 1 pentru definiții) presupunând o cinetică de ordinul întâi (a se vedea apendicele 2 pentru calcule). În cazul în care cinetica de ordinul întâi este clar inaplicabilă, trebuie utilizate alte modele.

15. Constanta vitezei de absorbție, constanta vitezei de eliminare (sau constantele, în cazul în care sunt implicate alte modele), factorul de bioacumulare cinetic (BAF_K) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri, se calculează plecând de la ecuații de modelare informatice (a se vedea apendicele 2 pentru orientare). Calitatea ajustării oricărui model poate fi determinată, de exemplu, din coeficientul de corelare sau coeficientul de determinare (coeficienții apropiați de unu indică o bună calitate a ajustării) sau testul chi-pătrat. De asemenea, mărimea erorii standard sau limita de încredere în jurul parametrilor estimați poate fi un indicator al calității ajustării modelului.

16. Pentru a reduce variabilitatea rezultatelor testului pentru substanțe chimice testate cu caracter foarte lipofil, factorii de bioacumulare trebuie exprimați în raport cu conținutul lipidic și conținutul de carbon organic (kg carbon organic sol (CO) kg-1 conținut lipidic vierme). Aceasta abordare se bazează pe faptul că, pentru unele clase de substanțe chimice, există o relație clară între potențialul de bioacumulare și caracterul lipofil; această relație a fost bine stabilită pentru pești (47). Există o relație între conținutul de lipide al peștilor și bioacumularea unor astfel de substanțe chimice. Pentru organismele bentice au fost identificate corelări similare, de exemplu (30) (44). În mod similar, această corelare a fost demonstrată pentru oligochetele terestre, de exemplu (5) (6) (7) (14). Dacă este disponibil suficient țesut de vierme, conținutul de lipide al animalelor testate poate fi determinat pe același material biologic ca cel utilizat pentru determinarea concentrației de substanță chimică testată. Ca alternativă, pot fi utilizate animale martor pentru măsurarea conținutului de lipide.

VALIDITATEA TESTULUI

17. Pentru ca un test să fie valid, următoarele criterii trebuie îndeplinite atât de grupurile martor cât și de cele de tratate:

— la finalul testului, mortalitatea totală în cursul fazei de absorbție și a celei de eliminare nu trebuie să depășească 10 % (la râme) sau 20 % (la enchitreide) din numărul total al viermilor introduși;

— pentru *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei*, pierderea masică medie măsurată la finalul fazei de absorbție și la finalul fazei de eliminare nu trebuie să depășească 20 % comparativ cu masa proaspătă inițială (m.p.) la începutul fiecărei faze.

DESCRIEREA METODEI

Speciile folosite pentru testare:

18. Pentru testarea bioacumulării sunt recomandate mai multe specii de oligochete terestre. Speciile cel mai frecvent folosite [*Eisenia fetida* sau *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*) sau *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* sau *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*)] sunt descrise în apendicele 5.

▼M4

Aparatură

19. Se vor evita materialele care pot adsorbi, dizolva substanța chimică testată sau care pot lesiva alte substanțe chimice și care pot avea un efect indezirabil asupra animalelor testate, aceasta fiind valabilă pentru toate componentele echipamentelor folosite. Pot fi folosite vase standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material inert chimic și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare, adică cu numărul de viermi testați. Pentru orice echipamente care intră în contact cu mediul de testare poate fi folosit oțel inoxidabil, plastic sau sticlă. Vasele de testare trebuie acoperite în mod corespunzător pentru a preveni răspândirea viermilor, permițând totodată pătrunderea unei cantități suficiente de aer. Pentru substanțele chimice cu coeficienți mari de adsorbție, cum ar fi piretrinele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În aceste cazuri, echipamentul se va elimina după utilizare (49). Trebuie prevenită degajarea substanțelor testate marcate radioactiv și a substanțelor chimice volatile. Trebuie utilizate separatoare (de exemplu, flacoane din sticlă pentru spălare cu gaz) care să conțină substanțe absorbante adecvate pentru a reține orice reziduuri care se evaporă din vasele de testare.

Sol

20. Calitatea solului testat trebuie să permită supraviețuirea și, de preferat, reproducerea organismelor testate în perioada de aclimatizare și în cursul experimentului, fără apariția vreunui comportament anormal. Viermii trebuie introduși în sol.

21. Solul artificial descris la capitolul C.8 din prezenta anexă (48) este recomandat spre a fi utilizat ca substrat în teste. Prepararea solului artificial pentru a fi utilizat în testele de bioacumulare și recomandările privind păstrarea solului artificial sunt prezentate în apendicele 4. Solul artificial uscat cu aer poate fi păstrat la temperatura camerei până la utilizare.

22. Totuși, solurile naturale care provin din amplasamente nepoluate pot servi drept sol pentru testare/cultură. Solurile naturale trebuie să fie caracterizate cel puțin prin origine (locul de colectare), pH, conținut de carbon organic, granulometrie (procent de nisip, aluviuni și argilă), capacitatea maximă de reținere a apei (CRAmax) și conținutul procentual de apă (3). Analiza solului sau a constituenților acestuia, anterior utilizării, din punct de vedere al micropoluanților ar trebui să furnizeze informații utile. În cazul în care se utilizează sol prelevat de pe terenuri agricole, acesta nu trebuie să fi fost tratat cu produse pentru protecția recoltei sau cu bălegar de la animale tratate ca fertilizatori, timp de cel puțin un an, și nici cu fertilizatori organici, timp de cel puțin șase luni înainte de prelevarea probelor (50). Procedurile de manipulare pentru solurile naturale anterior utilizării în teste ecotoxicologice de laborator cu oligochete sunt descrise în (3). Pentru solurile naturale, perioada de păstrare în laborator trebuie să fie cât mai scurtă cu putință.

Aplicarea substanței chimice testate

23. Substanța chimică testată se încorporează în sol. Trebuie să se țină cont de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate. O substanță chimică testată solubilă în apă trebuie să fie complet dizolvată în apă înainte de a fi amestecată cu solul. Procedura de îmbogățire recomandată pentru substanțele chimice testate cu solubilitate redusă în apă implică acoperirea unuia sau a mai multor constituenți ai solului (artificial) cu substanța chimică testată. De exemplu, nisip de cuarț sau o parte din acesta poate fi îmbibată cu o soluție de substanță chimică testată într-un solvent organic corespunzător, care este apoi evaporat lent până la uscare. Fracțiunea acoperită poate fi apoi amestecată cu solul umed. Avantajul major al acestei proceduri este acela că în sol nu se introduce solvent. Când se utilizează un sol natural, substanța chimică testată poate fi adăugată prin

▼M4

îmbogățirea unei părți de sol uscate cu aer, astfel cum este descris mai sus pentru solul artificial, sau prin amestecarea substanței chimice testate într-un sol umed, însoțită de un pas ulterior de evaporare dacă se utilizează un agent de solubilizare. În general, trebuie evitat, în măsura în care este posibil, contactul solului umed cu solvenți. Se au în vedere cele menționate în continuare (3):

— dacă se utilizează un alt solvent în afară de apă, acesta trebuie să fie unul miscibil în apă și/sau care poate fi eliminat (de exemplu, evaporat), lăsând în sol numai substanța chimică testată;

— dacă se utilizează un martor tratat cu solvent, nu sunt necesari martori negativi. Martorul tratat cu solvent trebuie să conțină cea mai mare concentrație de solvent adăugat în sol și ar trebui să utilizeze un solvent din același lot cu cel folosit pentru a prepara soluția stoc. Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței chimice testate în solventul ales ar trebui să reprezinte principalele criterii folosite pentru selecția unui agent de solubilizare adecvat.

24. Pentru substanțele chimice cu solubilitate redusă în apă și în solvenți organici, pot fi amestecate 2,0-2,5 g de nisip de cuarț fin măcinat pe vas de testare cu cantitatea de substanța chimică testată, de exemplu folosind un mojar și un pistil, pentru a obține concentrația dorită a substanței testate. Acest amestec de nisip de cuarț și substanță chimică testată se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine cu o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final se distribuie în vasele de testare. Procedura se repetă pentru fiecare concentrație a substanței testate, pregătindu-se, de asemenea, o probă martor adecvată cu 2,0-2,5 g de nisip de cuarț fin măcinat pe vas de testare.

25. Se determină concentrația substanței chimice testate în sol după îmbogățire. Înainte de introducerea organismelor testate trebuie verificată distribuirea omogenă a substanței chimice testate în sol. Metoda utilizată pentru îmbogățire și motivele pentru alegerea unei proceduri de îmbogățire specifice trebuie raportate (24).

26. În mod ideal, ar trebui realizat un echilibru între sol și apa interstițială înainte de adăugarea organismelor; se recomandă o perioadă de timp de patru zile la 20 °C. Pentru multe substanțe chimice organice cu solubilitate scăzută în apă timpul necesar pentru a se atinge un echilibru real între fracțiile adsorbită și dizolvată poate fi de ordinul zilelor sau al lunilor. În funcție de scopul studiului, de exemplu atunci când urmează a fi simulate condițiile de mediu, îmbogățirea solului poate fi „învechită” pentru o perioadă mai îndelungată, de exemplu, pentru metale, trei săptămâni la 20 °C (22).

Creșterea organismelor testate

27. Viermii ar trebui, de preferat, ținuți în cultură de laborator permanentă. Ghidul privind metodele culturilor de laborator pentru speciile *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* și *Enchytraeid*, este prezentat în apendicele 5 [a se vedea și (48) (51) (52)].

28. Viermii folosiți în teste ar trebui să nu prezinte boli, anormalități sau paraziți vizibili.

DESFĂȘURAREA TESTULUI

29. Organismele testate sunt expuse la substanța chimică testată în timpul fazei de absorbție. Faza de absorbție ar trebui să dureze 14 zile (la enchitreide) sau 21 de zile (la râme), cu excepția cazului în care se demonstrează că s-a atins starea de echilibru.

▼M4

30. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sol fără substanță chimică testată. Prima probă ar trebui să fie prelevată la 4-24 h după inițierea fazei de eliminare. Exemple de grafice de prelevare pentru ziua 21 a unei faze de absorbție și ziua 21 a unei faze de eliminare sunt prezentate în apendicele 3.

Organismele testate

31. Pentru multe specii de enchitreide terestre greutatea individuală este foarte mică (de exemplu, 5-10 mg greutate umedă pe individ pentru *Enchytraeus albidus* și mai mică pentru *Enchytraeus crypticus* sau *Enchytraeus luxuriosus*); pentru a efectua măsurători ale greutății și analiza chimică este posibil să fie necesar ca viermii din vasele de testare duplicat să fie puși laolaltă (adică vor fi utilizați toți viermii dintr-un vas duplicat pentru a obține un răspuns pentru țesutul analizat). În fiecare vas duplicat se adaugă 20 de enchitreide și ar trebui utilizate cel puțin trei vase duplicat. Dacă limita de detecție analitică a substanței chimice testate este mare vor fi necesari mai mulți viermi. Pentru speciile testate cu greutate individuală mai mare (*Eisenia fetida* și *Eisenia andrei*), pot fi utilizate vase duplicat care conțin un individ.

32. Râmele folosite într-un test ar trebui să aibă greutăți asemănătoare (de exemplu, *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* ar trebui să aibă o greutate individuală de 250-600 mg). Enchitreidele (de exemplu *Enchytraeus albidus*) ar trebui să aibă lungimea de aproximativ 1 cm. Toți viermii folosiți într-un anumit test ar trebui să provină din aceeași sursă și ar trebui să fie animale adulte cu clitelum (a se vedea apendicele 5). Deoarece greutatea și vârsta unui animal pot afecta valorile BAF (de exemplu, datorită conținutului diferit de lipide și/sau al prezenței ouălor), acești parametri ar trebui înregistrați cu acuratețe și avuți în vedere la interpretarea rezultatelor. În plus, în timpul perioadei de expunere pot fi depuși coconi, care vor avea de asemenea un impact asupra valorilor BAF. Este indicat ca o subprobă din viermii testați să fie cântărită înainte de experiment, pentru estimarea greutăților medii umede și uscate.

33. Ar trebui utilizat un raport sol-vierme mare pentru a se micșora creșterea concentrației substanței chimice testate în sol în timpul fazei de absorbție. Pentru *Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* se recomandă o cantitate minimă de 50 g greutate uscată (g.u.) de sol pe vierme, iar pentru enchitreide un minim de 10-20 g.u. de sol pe vas de testare. Vasele ar trebui să conțină un strat de sol de 2-3 cm (pentru enchitreide) sau de 4-5 cm (pentru râme).

34. Viermii folosiți într-un test sunt scoși din cultură (de exemplu, enchitreidele prin utilizarea pensetelor de bijutier). Animalele adulte sunt transferate într-un sol de test netratat, pentru aclimatizare, și hrănite (a se vedea punctul 36). În cazul în care condițiile de testare diferă de condițiile de creștere, o fază de aclimatizare de 24-72 h ar trebui să fie suficientă pentru adaptarea viermilor la condițiile de testare. După aclimatizare, râmele sunt clătite prin transferarea în recipiente de sticlă (de exemplu, cutii Petri) care conțin apă curată, iar ulterior, înainte de a fi adăugate în solul de testare, sunt cântărite. Înaintea cântăririi, trebuie îndepărtat excesul de apă din viermi apăsându-i ușor de marginea recipientului sau tamponându-i cu atenție până se usucă, cu un prosop de hârtie puțin umezit.

35. Comportamentul organismelor la intrarea în sol ar trebui urmărit și înregistrat. În mod obișnuit, în testele cu râme, animalele (loturile de control și cele tratate) intră în sol în decurs de câteva ore; acest lucru ar trebui verificat după cel mult 24 h de la adăugarea viermilor în vasele de testare. În cazul în care râmele nu reușesc să intre în sol (de exemplu, mai mult de 10 % nu intră în sol într-un timp care depășește jumate din faza de absorbție), aceasta indică faptul că fie condițiile de testare nu sunt adecvate,

▼M4

fie organismele testate nu sunt sănătoase. În acest caz, testul ar trebui oprit și repetat. Enchitreidele trăiesc în principal în porii interstițiali ai solului și deseori tegumentul acestora poate intra doar parțial în contact cu substratul înconjurător; expunerea enchitreidelor care au intrat în sol și a celor care nu au intrat se presupune a fi echivalentă, iar neintrarea în sol a enchitreidelor nu impune în mod necesar repetarea testului.

Hrănirea

36. Hrănirea ar trebui să fie avută în vedere când este utilizat un sol cu conținut de carbon organic total scăzut. Atunci când se utilizează un sol artificial, se recomandă o rație alimentară săptămânală (adică viermii trebuie hrăniți o dată pe săptămână) de 7 mg de bălegar uscat pe g de sol greutate uscată pentru râme, iar pentru enchitreide se recomandă o rație săptămânală de 2-2,5 mg de bază de fulgi de ovăz măcinați pe g de sol greutate uscată (11). Prima rație alimentară ar trebui amestecată cu solul imediat înainte de adăugarea organismelor de testare. Ar trebui utilizat de preferat același tip de hrană cu cel din culturi (a se vedea apendicele 5).

Lumina și temperatura

37. Testele ar trebui să se desfășoare la un ciclu controlat lumină/întuneric de 16/8 ore, de preferat la un nivel de iluminare în zona vaselor de testare de 400-800 lx (3). Temperatura de testare ar trebui să fie 20 ± 2 °C pe tot parcursul testului.

Concentrațiile substanței testate

38. Se folosește o singură concentrație a substanței testate. Cazurile în care este (sunt) necesară (necesare) o concentrație (concentrații) suplimentară (suplimentare) a(le) substanței testate ar trebui să fie justificate. Dacă toxicitatea (CEx) a substanței chimice testate este apropiată de limita de detecție analitică, se recomandă utilizarea unei substanțe chimice de testat marcată radioactiv, cu o radioactivitate specifică ridicată. Pentru metale, concentrația substanței testate ar trebui să depășească nivelul de bază din țesut și din sol.

Vase duplicat

39. Pentru măsurătorile cinetice (faza de absorbție și faza de eliminare), numărul minim de vase duplicat tratate ar trebui să fie de trei pentru fiecare punct de prelevare a probelor. Numărul total de vase duplicat pregătite ar trebui să fie suficient pentru a acoperi toate intervalele de prelevare a probelor din timpul fazei de absorbție și al fazei de eliminare.

40. Pentru observațiile și măsurătorile biologice (de exemplu, raport greutate uscată- greutate umedă, conținut de lipide) și pentru analiza concentrațiilor de bază ale substanței testate din viermi și din sol, ar trebui prevăzute cel puțin 12 vase duplicat ale unui martor negativ (patru probe prelevate la inițiere, patru la finalizarea absorbției și patru la finalizarea eliminării) dacă nu este utilizat un alt solvent în afară de apă. Dacă pentru aplicarea substanței chimice testate se utilizează orice agent de solubilizare, pe lângă vasele duplicat tratate, ar trebui realizat un martor tratat cu solvent (ar trebui prelevate probe din patru vase duplicat la inițiere, din patru la finalul fazei de absorbție și din patru la finalul fazei de eliminare) care să conțină toți constituenții, mai puțin substanța testată. În acest caz, este posibil să fie prevăzute patru vase duplicat suplimentare cu martor negativ (fără solvent) pentru prelevarea opțională de probe la finalul fazei de absorbție. Aceste vase duplicat pot fi comparate din punct de vedere biologic cu martorul tratat cu solvent pentru a se obține informații privind posibila influență a solventului asupra organismelor testate. Se recomandă realizarea unui număr suficient de vase duplicat de rezervă suplimentare (de exemplu, opt) pentru tratament și martor(i).

▼M4

Frecvența de măsurare a calității solului

41. pH-ul solului, conținutul de umiditate al solului și temperatura (permanentă) din camera de testare trebuie măsurate la începutul și la finalul fazelor de absorbție și de eliminare. O dată pe săptămână ar trebui controlat conținutul de umiditate al solului prin cântărirea vaselor de testare și compararea greutăților curente cu greutățile inițiale de la începutul testului. Pierderile de apă ar trebui compensate prin adăugarea de apă deionizată.

Prelevarea probelor și analiza viermilor și a solului

42. Un exemplu de grafic pentru fazele de absorbție și de eliminare în testele de bioacumulare la râme și enchitreide este prezentat în apendicele 3.

43. Probele de sol se prelevează din vasele de testare pentru determinarea concentrației substanței chimice testate înainte de introducerea viermilor și în timpul fazelor de absorbție și de eliminare. În timpul testului, concentrațiile substanței chimice testate se determină în viermi și în sol. În general, se măsoară concentrațiile totale din sol. Opțional, pot fi măsurate concentrațiile din apa interstițială; în acest caz, ar trebui asigurate metode justificate și adecvate, anterior inițierii unui studiu, și incluse în raport.

44. Probele din viermi și sol se prelevează de cel puțin șase ori în timpul fazelor de absorbție și de eliminare. Dacă stabilitatea unei substanțe chimice testate este demonstrată, numărul de analize ale solului poate fi redus. Se recomandă analizarea a cel puțin trei vase duplicat la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție. În cazul în care concentrația substanței testate din sol măsurată la sfârșitul fazei de absorbție diferă față de concentrația inițială cu mai mult de 30 %, ar trebui ca probele de sol prelevate la alte date să fie, de asemenea, analizate.

45. Se scot viermii din solul dintr-un vas duplicat dat de fiecare dată când se prelevează probe (de exemplu, după ce solul dintr-un vas duplicat a fost întins pe o tavă puțin adâncă și au fost scoși viermii folosind pensete moi de bijutier), se spală rapid cu apă într-un pahar puțin adânc sau pe o tavă de oțel. Se îndepărtează apa în exces (a se vedea punctul 34). Se transferă viermii cu grijă într-un vas precântărit, se cântăresc imediat, inclusiv conținutul intestinelor.

46. Râmelor (*Eisenia* sp.) ar trebui apoi să li se permită să purjeze conținutul intestinelor în timpul nopții, de exemplu pe un filtru de hârtie umed într-o cutie Petri acoperită (a se vedea punctul 34). După purjare, ar trebui determinată greutatea viermilor pentru a se putea evalua posibila scădere a biomasei în timpul testului (a se vedea criteriile de validare de la punctul 17). Cântărirea și analiza țesutului enchitreidelor se realizează fără purjare, deoarece este dificil de realizat din punct de vedere tehnic datorită dimensiunii mici a acestor viermi. După determinarea greutății finale, viermii ar trebui omorâți imediat, folosind metoda cea mai adecvată (de exemplu, folosind azot lichid sau înghețarea la temperaturi sub – 18 °C).

47. În timpul fazei de eliminare, viermii înlocuiesc conținutul contaminat al intestinelor cu sol curat. Aceasta înseamnă că măsurătorile viermilor nepurjați (în acest context enchitreide) din care s-au prelevat probe imediat după faza de eliminare includ sol contaminat în intestine. Pentru oligochetele acvatice se presupune că după primele 4-24 h ale fazei de eliminare cea mai mare parte a conținutului contaminat din intestine a fost înlocuit cu sediment curat, de exemplu (46). Constatări similare au fost raportate pentru râme în studiile privind acumularea de cadmiu și zinc marcate radioactiv (78). În enchitreidele nepurjate, concentrația acestei prime probe din faza de eliminare poate fi considerată drept concentrația din țesut după purjarea intestinelor. Pentru a ține cont de diluția concentrației substanței testate în funcție de solul necontaminat în timpul fazei de eliminare, greutatea conținutului intestinelor poate fi estimată din raportul greutate umedă vierme/greutate cenușă vierme.

▼M4

48. Probele de sol și de vierme ar trebui analizate, de preferință, imediat după ce au fost prelevate (adică în decurs de 1-2 zile) pentru a se preveni degradarea sau alte pierderi și se recomandă calcularea vitezelor de absorbție și de eliminare aproximative pe măsură ce testul avansează. În cazul în care analiza este întârziată, probele ar trebui păstrate folosind o metodă corespunzătoare, de exemplu prin congelare (≤ – 18 °C).

49. Ar trebui verificat faptul că precizia și reproductibilitatea analizei chimice, precum și recuperarea substanței chimice testate din probele de sol și de viermi sunt satisfăcătoare pentru metoda dată; ar trebui raportate randamentului extracției, limita de detecție și limita de cuantificare. În mod similar, ar trebui verificat faptul că substanța chimică testată nu este detectabilă în vasele cu martor la concentrații mai mari decât cea de bază. Atunci când concentrația unei substanțe chimice testate în organismul testat Ca este > 0 în viermii din probele martor, aceasta ar trebui inclusă în calculul parametrilor cinetici (a se vedea apendicele 2). Toate probele trebuie manipulate în timpul testului astfel încât să se reducă contaminarea și pierderea (care ar putea rezulta, de exemplu, din adsorbția substanței chimice testate pe dispozitivul de prelevare a probelor).

50. Când se lucrează cu substanțe chimice testate marcate radioactiv este posibil să se analizeze substanța de origine și metaboliții. Cuantificarea substanței chimice testate de origine și a metaboliților la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție furnizează informații importante. Probele ar trebui să fie apoi „curățate” astfel încât substanța chimică testată de origine să poată fi cuantificată separat. Dacă metaboliții simpli depășesc 10 % din radioactivitatea totală în proba (probele) analizate, se recomandă identificarea acestor metaboliți.

51. Recuperarea globală și recuperarea substanței chimice testate din viermi, din sol și, dacă sunt utilizate, din separatoarele care conțin substanțe absorbante pentru a reține substanța chimică testată evaporată, ar trebui înregistrate și raportate.

52. Gruparea probelor provenite de la indivizii dintr-un vas de testare dat este acceptabilă pentru viermii enchitreide care sunt mai mici decât râmele. Dacă gruparea implică reducerea numărului de vase duplicat, aceasta limitează procedurile statistice care pot fi aplicate datelor. Dacă se cere o procedură statistică specifică și o anumită putere, atunci ar trebui inclus în test un număr adecvat de vase de testare duplicat pentru a se adapta grupării, procedurii și puterii cerute.

53. Se recomandă ca BAF să fie exprimat atât în funcție de greutatea uscată totală, cât și, dacă este necesar (adică pentru substanțele chimice foarte hidrofobe), în funcție de conținutul de lipide. Ar trebui utilizate metode adecvate pentru determinarea conținutului de lipide [unele metode existente – de exemplu (31) sau (58) – ar trebui adaptate în acest scop]. Aceste metode utilizează o tehnică de extracție cloroform/metanol. Totuși, pentru a evita utilizarea solvenților clorurați, ar trebui utilizată o modificare a metodei Bligh și Dyer (9) astfel cum este descrisă în (17). Întrucât metodele diferite nu oferă rezultate identice, este important să se precizeze detaliile metodei utilizate. Când este posibil, adică atunci când este disponibil suficient țesut de vierme, ar fi ideal ca analiza lipidelor să se facă pe aceleași probe sau extracte utilizate și pentru analiza substanței chimice testate, întrucât, deseori lipidele trebuie îndepărtate din extras înainte ca acesta să poată fi analizat prin cromatografie (49). Ca alternativă, animalele martor pot fi folosite pentru a măsura conținutul de lipide, care poate fi utilizat apoi pentru ajustarea valorilor BAF. Această din urmă abordare reduce contaminarea echipamentelor cu substanța chimică testată.

▼M4

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

54. Curba de absorbție a substanței chimice testate va rezulta prin trasarea concentrației sale din/de pe viermi în funcție de timp, în perioada fazei de absorbție, folosind o scară aritmetică. Când curba a atins un platou sau starea de echilibru (a se vedea definiția din apendicele 1), factorul de bioacumulare al stării de echilibru (BAFss) se calculează din:

$$\frac{C_a \text{ la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție (medie)}}{C_s \text{ la starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție (medie)}}$$

C_a este concentrația substanței chimice testate în organismul testat

C_s este concentrația substanței chimice testate în sol

55. Când nu se atinge starea de echilibru, BAF_K, ar trebui determinat în schimb BAFss, pe baza constantelor vitezei, astfel cum este descris mai jos:

— se determină factorul de acumulare (BAF_K) ca raport între k_s/k_e;

— este de preferat ca vitezele de absorbție și de eliminare să fie calculate simultan (a se vedea ecuația 11 din apendicele 2);

— constanta vitezei de eliminare (k_e) se determină de obicei din curba de eliminare (adică un grafic al concentrației substanței testate din viermi în timpul fazei de eliminare). Constanta vitezei de absorbție k_s se calculează apoi în funcție de k_e și de o valoare C_a care se determină din curba de absorbție – a se vedea apendicele 2 pentru descrierea acestor metode. Metoda cea mai bună pentru obținerea BAF_K și a constantelor de viteză k_s și k_e, este aceea care recurge la metode informatice neliniare de estimare a parametrilor. Dacă este clar că eliminarea nu este de ordinul întâi, atunci ar trebui utilizate modele mult mai complexe.

Raportul de testare

56. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța chimică testată:

— orice informație disponibilă cu privire la toxicitatea acută sau pe termen lung (de exemplu, CE_x, CL_x, CFEO) a substanței chimice testate față de oligochetele bentice;

— puritatea, natura fizică și proprietățile fizico-chimice, de exemplu log K_{ow}, solubilitatea în apă;

— datele de identificare a substanței chimice; sursa substanței testate, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat;

— dacă se utilizează o substanță chimică de testat marcată radioactiv, poziția exactă a atomilor marcați, radioactivitatea specifică și puritatea radiochimică.

Speciile folosite pentru testare:

— denumire științifică, sușă, sursă, orice tratament prealabil eventual, aclimatizare, vârstă, gama de dimensiuni etc.

▼M4

Condițiile de testare:

— procedura de încercare utilizată;

— tipul și caracteristicile iluminării utilizate și perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— protocolul testului (de exemplu, numărul și dimensiunea vaselor de testare, masa solului și înălțimea stratului de sol, numărul de duplicate, numărul de viermi, numărul de concentrații testate, durata fazelor de absorbție și de eliminare, frecvența prelevării);

— justificarea alegerii materialului vasului de testare;

— metoda de preparare și aplicare a substanței testate, precum și motivele alegerii acestei metode specifice;

— concentrațiile experimentale nominale, mediile valorilor măsurate și abaterile standard ale acestora în vasele de testare, precum și metoda prin care aceste valori au fost obținute;

— sursa constituenților solului artificial sau – dacă sunt utilizate medii naturale – originea solului, descrierea oricărui pretratament, rezultatele verificărilor (supraviețuire, dezvoltarea de biomasă, reproducere), caracteristicile solului [pH, conținut de carbon organic total, granulometrie (procent de nisip, aluviuni și argilă), CRA_{max}, conținut procentual de apă la începutul și la sfârșitul testului și orice alte măsurători realizate];

— informații detaliate privind tratamentul probelor de sol și de viermi, inclusiv detalii privind prepararea, păstrarea, procedurile de îmbogățire, extracție și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța testată din viermi și din sol și conținutul de lipide (dacă a fost măsurat) și recuperările substanței testate.

Rezultatele:

— mortalitatea viermilor martor și a viermilor din fiecare vas de testare și orice comportament anormal observat (de exemplu, evitarea solului, lipsa reproducerii într-un test de bioacumulare cu enchitreide);

— raportul greutate uscată/greutate umedă al solului și al organismelor testate (util pentru normalizare);

— greutățile umede ale viermilor la fiecare prelevare de probe; pentru râme, greutățile umede la începutul și la sfârșitul testului și la fiecare prelevare de probe înainte și după purjarea intestinelor;

— conținutul de lipide al organismelor testate (dacă a fost determinat);

— curbe care indică cinetica de absorbție și de eliminare ale substanței chimice testate în viermi și timpul până la starea de echilibru;

— C_a și C_s (împreună cu abaterea standard și intervalul, dacă este cazul) pentru toate momentele de prelevare a probelor (C_a exprimată în g kg^{-1} greutate umedă și uscată a întregului organism, C_s exprimată în g kg^{-1} greutate umedă și uscată a solului). Dacă se cere un factor de acumulare biotă-sol (BSAF) (de exemplu, pentru compararea rezultatelor obținute din două sau mai multe teste efectuate cu animale cu conținut diferit de lipide), C_a poate fi exprimată suplimentar ca g kg^{-1} conținut de lipide din organism, iar C_s poate fi exprimată ca g kg^{-1} carbon organic (CO) din sol;

— BAF (exprimat în kg sol·kg^{-1} vierme), constanta vitezei de absorbție k_s (exprimată în g sol kg^{-1} de vierme zi^{-1}) și constanta vitezei de eliminare k_e (exprimată în $zile^{-1}$); BSAF (exprimat în kg sol CO kg^{-1} conținut de lipide vierme) pot fi raportate suplimentar;

▼M4

— dacă se măsoară: procentajele substanței chimice testate de origine, ale metaboliților și reziduurilor legate (adică procentul de substanță chimică testată care nu poate fi extras prin metode de extracție obișnuite) detectate în sol și în animalele testate;

— metodele utilizate pentru analizele statistice ale datelor.

Evaluarea rezultatelor:

— concordanța rezultatelor cu criteriile de validitate, astfel cum sunt enumerate la punctul 17;

— rezultatele neprevăzute sau neobișnuite, de exemplu, eliminarea incompletă a substanței chimice testate din animalele testate.

BIBLIOGRAFIE:

(1) Amorim M (2000), Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000), Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004), Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*, ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), The assessment of bioaccumulation. În Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil, Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. și Hermens J. (1993), The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water, Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995), Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*), Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell A.W. (1958), The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*, Ann. WHX Novitat., 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. și Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M. (1972), Lombriciens de France. Ecologie et Systematique, INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a), Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Raport către Agenția federală germană de mediu (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b), Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida), Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder J.M. și Lanno R.P. (2003), Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*, J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990), Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System, Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993), Ecology of Terrestrial Enchytraeidae, Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003), Oligochaeta, în: Bioindicators and biomonitors. Markert B.A., Breure A.M. și Zechmeister H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Țările de Jos, pp. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999), Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995), Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Regulamentul (CE) nr. 1907/2006 al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH), de înființare a Agenției Europene pentru Produse Chimice, de modificare a Directivei 1999/45/CE și de abrogare a Regulamentului (CEE) nr. 793/93 al Consiliului și a Regulamentului (CE) nr. 1488/94 al Comisiei, precum și a Directivei 76/769/CEE a Consiliului și a Directivelor 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE și 2000/21/CE ale Comisiei (JO L 396, 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996), Biology and ecology of earthworms, third edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009), Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Poate fi descărcat de la: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N. și Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000), Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations, National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995), Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant, Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003), Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C. (1996), How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?, Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994), The assessment of bioaccumulation, Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C. (1996), Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003), Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990), A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes, Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985), Micromethods for lipids in aquatic invertebrates, Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish, Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000), Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. În: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Calitatea solului – Efectele poluanților asupra râmelor (*Eisenia fetida*). Partea 2: Determinarea efectelor asupra reproducerii.

(36) Jaenike J. (1982), „*Eisenia foetida*" is two biological species, Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998), Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta), Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil, Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta), Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982), Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems, Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990), Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Disertație, Universitatea München, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989), Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997), Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions, Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999), Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*, Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M. (1991), QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, în: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capitolul C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme”.

(49) Capitolul C.13 din prezenta anexă, „Bioconcentrarea: Experiența cu reînnoire continuă asupra peștilor”.

(50) Capitolul C.21 din prezenta anexă, „Microorganismele din sol: Testul de transformare a azotului”.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H. and Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes, Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993), Bioaccumulation. În: Handbook of Ecotoxicology, vol. 1, Calow P. (ed.), Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem, Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996), Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*, RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H, Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele P, Füll C. (1998), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium, UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. and Moser Th. (1999), Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test, UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), Enchytraeen als Testorganismen, în: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb, R., Dott W. & Eisentraeger A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H., (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999), Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation, Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. and Riepert F. (1992), Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung, Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. and Collado R. (1999), *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida), Carolinea 57: 93-100.

▼M4

(66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985), Earthworms, în: Kermack, D.M. & Barnes, R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod, Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.

(68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish, Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998), Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. În: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003), Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*, Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991), Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug, UBA-Texte 42/91, Berlin.

(72) US EPA (2000), Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, martie 2000.

(73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996), Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992), The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, in: Ecotoxicology of Earthworms (ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. şi Heimbach F.), Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. şi Ma W.-C. (1990), An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005), Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates, Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988), The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005), Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil, Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996), Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Apendicele 1

DEFINIȚII

Bioacumulare: creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism în raport cu concentrația acestei substanțe chimice în mediul ambiant. Bioacumularea rezultă atât din procesul de bioconcentrare, cât și din cel de bioamplificare (a se vedea mai jos).

Bioconcentrare: creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism, care rezultă din absorbția substanței chimice exclusiv din mediul înconjurător (adică prin intermediul suprafeței corpului și al solului ingerat), în raport cu concentrația substanței chimice testate în mediul înconjurător.

Bioamplificare: creșterea concentrației substanței chimice testate într-un sau pe un organism, care rezultă în principal din acumularea alimentelor sau prăzii contaminate, în raport cu concentrația substanței chimice testate în hrană sau în pradă. Bioamplificarea poate duce la un transfer sau la o acumulare a substanței testate în rețelele trofice.

Eliminarea unei substanțe chimice testate: pierderea acestei substanțe din țesutul organismului testat, prin procese active sau pasive, care se produc independent de prezența substanței testate în mediul înconjurător.

Factorul de bioacumulare (BAF): la orice moment în timpul fazei de absorbție a acestui test, factorul de bioacumulare reprezintă concentrația substanței chimice testate în/pe organismul testat (C_a în $g \cdot kg^{-1}$ greutate uscată vierme) împărțită la concentrația substanței chimice în mediul înconjurător (C_s exprimată în $g \cdot kg^{-1}$ greutate uscată sol); unitatea de măsură pentru BAF este kg sol·kg^{-1} vierme.

Factorul de bioacumulare al stării de echilibru (BAF_{ss}): BAF la starea de echilibru și nu se modifică în mod semnificativ în cursul unui interval lung de timp, concentrația substanței chimice testate în mediul înconjurător (C_s exprimată în $g \cdot kg^{-1}$ greutate uscată sol) fiind constantă în acest interval de timp.

Factorii de bioacumulare calculați direct din raportul dintre constanta vitezei de absorbție și constanta vitezei de eliminare (k_s și k_e, a se vedea mai jos) poartă denumirea de *factor de bioacumulare cinetic* (BAF_K).

Factorul de acumulare biotă-sol (BSAF): concentrația normalizată de lipide a substanței chimice testate în/pe organismul testat împărțită la concentrația normalizată de carbon organic a substanței chimice testate în sol la starea de echilibru. Astfel, C_a se exprimă în $g \cdot kg^{-1}$ conținut de lipide al organismului, iar C_s în $g \cdot kg^{-1}$ conținut organic al solului; unitatea de măsură pentru BSAF este kg CO·kg^{-1} lipide.

Platou sau stare de echilibru: echilibrul între procesele de absorbție și de eliminare care apar simultan în timpul fazei de expunere. Starea de echilibru este atinsă în graficul BAF în funcție de timp atunci când curba devine paralelă la axa timpului, iar trei analize succesive ale BAF – realizate asupra unor probe prelevate la intervale de cel puțin două zile – se mențin într-o plajă de 20 % una față de alta și nu există diferențe semnificative între cele trei perioade de prelevare a probelor. Pentru substanțele chimice testate care se absorb lent, intervalele cele mai adecvate ar fi de șapte zile (49).

Coeficientul de partiție carbon organic-apă (K_{oc}): raportul dintre o substanță chimică în/pe fracția de carbon organic a unui sol și concentrația substanței chimice în apă la echilibru.

Coeficientul de partiție octanol-apă (K_{ow}): raportul dintre solubilitatea unei substanțe chimice în n-octanol și în apă la echilibru, exprimată uneori și ca P_{ow}. Logaritmul lui K_{ow} (log K_{ow}) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare al unei substanțe chimice în organismele acvatice.

▼M4

Faza de absorbție sau de expunere: timpul în care organismele testate sunt expuse la substanța chimică testată.

Constanta vitezei de absorbție a solului (k_s): reprezintă valoarea numerică care definește viteza de creștere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat care rezultă din absorbția fazei solului. k_s se exprimă în g sol kg^{-1} vierme z^{-1}.

Faza de eliminare: timpul, după transferul organismelor dintr-un mediu contaminat într-un mediu în care nu se află substanța testată, în care se studiază eliminarea (sau pierderea netă) a substanței chimice din organismele testate.

Constanta vitezei de eliminare (k_e): valoarea numerică care definește viteza de scădere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat, după transferul organismelor testate dintr-un mediu care conține substanța testată într-un mediu fără substanță chimică; k_e se exprimă în z^{-1}.

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

▼M4

Apendicele 2

Calculul parametrilor de absorbție și de eliminare

Principalul indicator al unui test de bioacumulare este factorul de bioacumulare, BAF. BAF măsurat poate fi calculat prin împărțirea concentrației din organismul testat (C_a) la concentrația din sol (C_s) în starea de echilibru. Dacă starea de echilibru nu este atinsă în timpul fazei de absorbție, BAF_K se calculează din constantele de viteză în loc de BAFss. Totuși, ar trebui să se indice dacă BAF se bazează pe concentrațiile la starea de echilibru sau nu.

Modalitatea obișnuită pentru obținerea factorului de bioacumulare cinetic (BAF_K), a constantei vitezei de absorbție a solului (k_s) și a constantei vitezei de eliminare (k_e) este utilizarea metodelor informatice neliniare de estimare a parametrilor, de exemplu, pe baza modelelor descrise în (68). Fiind dat un set de date secvențiale concentrație timp și ecuațiile de modelare:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuația 1]}$$

sau

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuația 2]}$$

unde:

C_a = concentrația substanței chimice în viermi [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

k_s = constanta vitezei de absorbție în țesut [g sol kg-1 vierme z-1]

C_s = concentrația substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

k_e = constanta vitezei de eliminare [z-1]

t_c = timpul la finalul fazei de absorbție,

aceste programe informatice calculează valorile pentru BAF_K, k_s și k_e.

Când concentrația de bază în viermii neexpuși, de exemplu în ziua 0, diferă în mod semnificativ de zero (acesta poate fi, de exemplu, cazul metalelor), această concentrație de bază ($C_{a,}0$) ar trebui inclusă în aceste ecuații, care devin:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuația 5]}$$

și

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuația 4]}$$

În cazurile în care se observă o scădere semnificativă în timp a concentrației substanței chimice testate în sol, în cursul fazei de absorbție, pot fi utilizate următoarele modele, de exemplu (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[ecuația 5]}$$

▼M4

unde:

C_s = concentrația substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

k_0 = constanta vitezei de degradare în sol [z-1]

C_0 = concentrația inițială a substanței chimice în sol [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuația 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuația 7]}$$

unde:

C_a = concentrația substanței chimice în viermi [g kg-1 greutate umedă sau uscată]

k_s = constanta vitezei de absorbție în țesut [g sol kg-1 vierme z-1]

k_0 = constanta vitezei de degradare în sol [z-1]

k_e = constanta vitezei de eliminare [z-1]

t_c = timpul la finalul fazei de absorbție.

Când se atinge starea de echilibru în timpul fazei de absorbție (adică $t = \infty$), ecuația 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuația 1]}$$

poate fi redusă la:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

sau

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ecuația 8]}$$

Atunci, $k_s/k_e \times C_s$ reprezintă o aproximare a concentrației substanței testate în țesutul viermelui la starea de echilibru ($C_{a,se}$).

Factorul de acumulare biotă-sol (BSAF) poate fi calculat astfel:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ecuația 9]}$$

unde f_{oc} este fracția de carbon organic din sol, iar f_{lip} este fracția de lipide din vierme, ambele fiind determinate, de preferință, din probele prelevate din test, și bazate fie pe greutatea uscată, fie pe greutatea umedă.

Cinetica eliminării poate fi modelată folosind datele obținute din faza de eliminare și aplicând următoarea ecuație de modelare și o metodă informatică neliniară de estimare a parametrilor. Dacă punctele aferente datelor reprezentate grafic în funcție de timp indică o scădere exponențială constantă a concentrației substanței testate în animale, poate fi utilizat un model cu un compartiment (ecuația 9) pentru a descrie evoluția temporală a eliminării.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ecuația 10]}$$

▼M4

Uneori, procesele de eliminare par a se derula în două etape, indicând o scădere rapidă a C_a în timpul etapelor de început, care se modifică la o pierdere ușoară a substanțelor testate în etapele finale ale eliminării, de exemplu (27) (68). Cele două etape pot fi interpretate plecând de la ipoteza că în organism există două compartimente diferite din care substanța testată se elimină cu viteze diferite. În aceste cazuri, ar trebui studiată literatura de specialitate relevantă, de exemplu (38) (39) (40) (78).

Folosind ecuațiile de modelare de mai sus, parametrii cinetici (k_s și k_e) pot fi calculați și într-o singură etapă, aplicând modelul cineticii de ordinul întâi, simultan, tuturor datelor obținute din faza de absorbție și din cea de eliminare. Pentru o descriere a unei metode care ar putea permite un astfel de calcul combinat al constantelor vitezei de absorbție și de eliminare, pot fi consultate referințele bibliografice (41), (73) și (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[ecuația 11]}$$

Notă: Când parametrii de absorbție și de eliminare sunt estimați simultan din datele combinate de absorbție și de eliminare, „m” prezentat în ecuația 11 este un descriptor care permite programului informatic să atribuie subtermenii ecuației setului de date al fazei respective și să realizeze o evaluare corectă (m = 1 pentru faza de absorbție; m = 2 pentru faza de eliminare).

Cu toate acestea, aceste ecuații de modelare ar trebui utilizate cu prudență, mai ales atunci când în timpul testului apar modificări ale biodisponibilității substanței chimice testate sau ale (bio)degradării [a se vedea, de exemplu, (79)].

▼M4

Apendicele 3

EXEMPLE DE GRAFICE PENTRU TESTE DE BIOACUMULARE ÎN SOL

Test pe râme

(a) Faza de absorbție, cu 8 date de prelevare a probelor utilizate pentru calculul parametrilor cinetici

Ziua	Activitate
– 6	Condiționarea solului preparat timp de 48 h
– 4	Îmbogățirea fracțiunii de sol cu soluția de substanță chimică testată; evaporarea oricărui solvent; amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; echilibrarea condițiilor de testare timp de 4 zile (3 săptămâni pentru solul îmbogățit cu metale)
– 3 până la – 1	Separarea organismelor testate din cultură pentru aclimatizare; prepararea și umezirea constituenților solului
0	Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; prelevarea de probe din vasele tratate și a martorilor tratați cu solvent pentru determinarea concentrației substanței chimice testate; adăugarea rației alimentare; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; păstrarea unui număr suficient de subprobe de viermi pentru determinarea valorilor analitice de bază, a greutății umede și uscate și a conținutului de lipide; cântărirea tuturor vaselor de testare pentru verificarea umidității solului; verificarea alimentării cu aer în cazul în care se utilizează un sistem închis
1	Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței testate
2	La fel ca în ziua 1
3	Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii
4	La fel ca în ziua 1
5-6	La fel ca în ziua 3
7	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate
8-9	La fel ca în ziua 3
10	La fel ca în ziua 1
11-13	La fel ca în ziua 3
14	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate
15-16	La fel ca în ziua 3
17	La fel ca în ziua 1
18-20	La fel ca în ziua 3

▼**M4**

Ziua	Activitate
21	La fel ca în ziua 1; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; finalizarea fazei de absorbție; transferul viermilor din vasele duplicat expuse rămase în vasele care conțin sol curat pentru faza de eliminare (fără purjarea intestinelor); prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent
	Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) ar trebui programate ținând cont de proprietățile substanței chimice testate.
	Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).

(b) Faza de eliminare

Ziua	Activitate
– 6	Prepararea și umezirea constituenților solului; condiționarea solului preparat timp de 48 h
– 4	Amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; incubarea în condiții experimentale timp de 4 zile
0 (finalizarea fazei de absorbție)	Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; adăugarea rației alimentare; transferul viermilor din vasele duplicat expuse rămase în vasele care conțin sol curat; prelevarea de probe de sol și viermi după 4-6 h pentru determinarea concentrației substanței chimice testate
1	Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței chimice testate
2	La fel ca în ziua 1
3	Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii
4	La fel ca în ziua 1
5-6	La fel ca în ziua 3
7	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate
8-9	La fel ca în ziua 3
10	La fel ca în ziua 1
11-13	La fel ca în ziua 3
14	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate
15-16	La fel ca în ziua 3
17	La fel ca în ziua 1

▼M4

Ziua	Activitate
18-20	La fel ca în ziua 3
21	La fel ca în ziua 1; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent
	Prepararea solului înainte de începerea fazei de eliminare ar trebui realizată în același mod ca înainte de faza de absorbție.
	Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).

Test pe enchitreide

(a) Faza de absorbție, cu 8 date de prelevare a probelor utilizate pentru calculul parametrilor cinetici

Ziua	Activitate
– 6	Condiționarea solului preparat timp de 48 h
– 4	Îmbogățirea fracțiunii de sol cu soluția de substanță chimică testată; evaporarea oricărui solvent; amestecarea constituenților solului; repartizarea solului în vasele de testare; echilibrarea condițiilor de testare timp de 4 zile (3 săptămâni pentru solul îmbogățit cu metale)
– 3 până la –1	Separarea organismelor testate din cultură pentru aclimatizare; prepararea și umezirea constituenților solului
0	Măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; prelevarea de probe din vasele tratate și a martorilor tratați cu solvent pentru determinarea concentrației substanței chimice testate; adăugarea rației alimentare în sol; cântărirea și distribuirea aleatorie a viermilor în vasele de testare; păstrarea unui număr suficient de subprobe de viermi pentru determinarea valorilor analitice de bază, a greutății umede și uscate și a conținutului de lipide; cântărirea tuturor vaselor de testare pentru verificarea umidității solului; verificarea alimentării cu aer în cazul în care se utilizează un sistem închis
1	Verificarea alimentării cu aer, înregistrarea comportamentului viermilor și a temperaturii; prelevarea de probe de sol și viermi pentru determinarea concentrației substanței testate
2	La fel ca în ziua 1
3	Verificarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii
4	La fel ca în ziua 1
5-6	La fel ca în ziua 3
7	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare în sol; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare și compensarea apei evaporate
9	La fel ca în ziua 1
10	La fel ca în ziua 3

▼**M4**

Ziua	Activitate
11	La fel ca în ziua 1
12-13	La fel ca în ziua 3
14	La fel ca în ziua 1; adăugarea rației alimentare în sol; măsurarea temperaturii și a pH-ului solului; verificarea umidității solului prin recântărirea vaselor de testare; finalizarea fazei de absorbție; transferul viermilor din vasele duplicat expuse rămase în vasele care conțin sol curat pentru faza de eliminare (fără purjarea intestinelor); prelevarea de probe de sol și viermi din martorii tratați cu solvent
	Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) ar trebui programate ținând cont de proprietățile substanței chimice testate.
	Activitățile descrise pentru ziua 3 ar trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).

▼M4

Apendicele 4

Solul artificial – recomandări pentru preparare și păstrare

Deoarece este posibil ca solurile naturale care provin dintr-o sursă specifică să nu fie disponibile tot timpul anului, iar organismele indigene, precum și prezența micropoluanților pot influența testul, se recomandă utilizarea în cadrul acestui test a unui substrat artificial, solul artificial conform capitolului C.8 din prezenta anexă, „Toxicitatea la râme” (48). Mai multe specii testate pot supraviețui, crește și se pot reproduce în acest sol și sunt furnizate standardizarea maximă, precum și comparabilitatea intra- și interlaboratoare a condițiilor de testare și a cultivare.

Constituenții solului

Turbă:	10 %	Mușchi de turbă, în conformitate cu Orientarea 207 a OCDE (48)
Nisip de cuarț:	70 %	Nisip de cuarț industrial (uscat cu aer); dimensiune granule: mai mult de 50 % dintre particule ar trebui să se afle în intervalul 50-200 μm, însă toate particulele ar trebui să fie ≤ 2 mm
Argilă caolinică:	20 %	Conținut de caolinit ≥ 30 %
Carbonat de calciu:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulbere, chimic pur

Ca alternativă, conținutul de carbon organic din solul artificial poate fi redus, de exemplu prin scăderea conținutului de turbă la 4-5 % din solul uscat și creșterea corespunzătoare a conținutului de nisip. Prin această reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de absorbție ale substanței chimice testate în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice testate pentru viermi (74). S-a demonstrat că *Enchytraeus albidus* și *Eisenia fetida* pot satisface criteriile privind reproducerea când sunt testate pe soluri naturale cu conținut scăzut de carbon organic, de exemplu 2,7 % (33) (61), și s-a constatat experimental că aceasta se poate obține și în soluri artificiale cu 5 % turbă.

Preparare

Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare). Această operațiune trebuie realizată cu o săptămână înainte de inițierea testului. Constituenții solului uscați amestecați ar trebui umeziți cu apă deionizată timp de cel puțin 48 h înainte de aplicarea substanței testate pentru a se echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și soluție 1 M KCl într-un raport de 1:5. Dacă valoarea pH-ului nu este în intervalul cerut (6,0 ± 0,5), solului i se adaugă o cantitate suficientă de $CaCO_3$ sau se prepară un nou lot de sol.

Capacitatea maximă de reținere a apei (CRA) a solului artificial se determină în conformitate cu ISO 11268-2 (35). Cu cel puțin două zile înainte de inițierea testului, solul artificial uscat este umezit adăugându-se suficientă apă deionizată sau apă reconstituită pentru a se obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă. Conținutul final de apă ar trebui să fie de 40 % până la 60 % din CRA. La inițierea testului, solul preumezit este împărțit într-un număr de loturi egal cu numărul concentrațiilor substanței chimice testate și al martorilor utilizați pentru test, iar conținutul de umiditate se ajustează la 40-60 % din CRA_{max} utilizând soluția de substanță testată și/sau adăugând apă deionizată sau reconstituită. Conținutul de umiditate se determină la începutul și la sfârșitul testului (la 105 °C). Acesta ar trebui să fie optim pentru satisfacerea cerințelor speciilor (conținutul de umiditate poate fi verificat, de asemenea, după cum urmează: atunci când solul este strâns ușor în mână, ar trebui să apară picături mici de apă între degete).

▼**M4**

Păstrare

Constituenții uscați ai solului artificial pot fi păstrați la temperatura camerei până la utilizare. Solul preparat și preumezit poate fi păstrat într-un loc răcoros timp de până la trei zile anterior îmbogățirii; trebuie redus riscul de evaporare a apei. Solul îmbogățit cu substanța testată ar trebui utilizat imediat, exceptând cazul în care există informații care indică faptul că acel sol poate fi păstrat fără a fi afectate toxicitatea și biodisponibilitatea substanței testate. Probele de sol îmbogățit pot fi păstrate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță testată.

▼M4

Apendicele 5

Specii de oligochete terestre recomandate pentru testarea bioacumulării din sol

Râme

Specia recomandată pentru test este *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), care aparține familiei *Lumbricidae*. Din 1972 aceasta este împărțită în două subspecii [*Eisenia fetida* și *Eisenia andrei* (10)]. Conform Jaenike (36), acestea sunt specii autentice și separate. *Eisenia fetida* este ușor de recunoscut prin dungile sale galbene de culoare deschisă poziționate intersegmentar, în timp ce *Eisenia andrei* are o culoare uniformă, roșu închis. Fiind probabil originare din regiunea Mării Negre, în prezent acestea sunt prezente în întreaga lume, mai ales în habitatele modificate de activitatea antropică, cum sunt grămezile de compost. Ambele pot fi utilizate pentru teste ecotoxicologice, precum și pentru teste de bioacumulare.

Eisenia fetida și *Eisenia andrei* sunt disponibile în comerț, de exemplu ca momeală pentru pești. Comparativ cu celelalte râme lumbricide, acestea au un ciclu de viață scurt, ajungând la maturitate în aproximativ 2-3 luni (la temperatura camerei). Temperatura optimă pentru acestea este de aproximativ 20-24 °C. Ele preferă substraturi relativ umede, cu un pH aproape neutru și un conținut ridicat de material organic. Întrucât, în ultimii 25 de ani, aceste specii au fost utilizate pe scară largă în teste ecotoxicologice standardizate, creșterea lor este bine stabilită (48) (77).

Ambele specii pot fi înmulțite într-o gamă largă de deșeuri animale. Mediul de înmulțire recomandat de ISO (35) este un amestec de bălegar de cal sau bovine și turbă în raport de 50:50. Mediul ar trebui să aibă o valoare a pH-ului de 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu), o conductivitate ionică scăzută (mai puțin de 6 mS/cm sau o concentrație de sare mai mică de 0,5 %) și ar trebui să nu fie contaminat excesiv cu amoniac sau urină de origine animală. De asemenea, poate fi utilizat un sol de grădină disponibil în comerț, fără aditivi, sau un sol artificial în conformitate cu OCDE (48) sau un amestec 50:50 din ambele. Substratul trebuie să fie umed, dar nu prea ud. Sunt adecvate cutii de înmulțire cu un volum de 10 litri până la 50 de litri.

Pentru a se obține viermi cu o vârstă și greutate standard, cel mai bine este să se înceapă cu creșterea de coconi. Astfel, sunt adăugați viermi adulți în cutia de înmulțire, care conține un substrat proaspăt, pentru a produce coconi. Experiența practică a demonstrat că o densitate a populației de aproximativ 100 de viermi adulți pe kg de substrat (greutate umedă) conduce la rate de producție bune. După 28 de zile, viermii adulți sunt scoși. Râmele care au ieșit din coconi sunt folosite pentru testare când ajung la maturitate, după cel puțin 2 luni, dar fără să depășească 12 luni.

Viermii din speciile descrise mai sus pot fi considerați sănătoși dacă se mișcă prin substrat, nu încearcă să părăsească substratul și se reproduc continuu. O extremitate posterioară care se mișcă foarte lent sau este galbenă (în cazul *Eisenia fetida*) indică epuizarea substratului. În acest caz, se recomandă substrat proaspăt și/sau un număr mai mic de animale pe cutie.

Referințe bibliografice selecționate suplimentare

Gerard B.M. (1964), Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae, Linnean Soc., London, 6: 1-58.

Graff O. (1953), Die Regenwürmer Deutschlands, Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997), Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden, Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955), Some aspects of earthworm ecology, Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985), A synopsis of the earthworms, Linnean Soc., London, 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984), The earthworm bait market in North America. În: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell J.E. (ed.), Chapman și Hall, London, pp. 331-338.

Enchitreide

Specia recomandată pentru test este *Enchytraeus albidus,* Henle 1837 (viermele alb). *Enchytraeus albidus* este una dintre cele mai mari specii (până la 15 mm) din familia oligochetelor anelide *Enchytraeidae* și este prezentă în întreaga lume, de exemplu (8). *Enchytraeus albidus* se găsește în habitate marine, limnice și tericole, în special în materie organică aflată în descompunere (iarbă de mare, compost) și rareori în fânețe (42). Această toleranță ecologică mare și unele variații morfologice indică faptul că ar putea exista rase diferite ale acestei specii.

Enchytraeus albidus este disponibil în comerț, fiind vândut ca hrană pentru pești. Ar trebui verificat dacă cultura este contaminată cu alte specii, în general mai mici (60). În cazul în care apare contaminarea, toți viermii ar trebui spălați cu apă într-o cutie Petri. Specimenele adulte mari de *Enchytraeus albidus* sunt apoi selecționate (utilizând un stereomicroscop) pentru a iniția o nouă cultură. Toți ceilalți viermi sunt eliminați. Ciclul de viață al acestui vierme este scurt întrucât maturitatea este atinsă între 33 de zile (la 18 °C) și 74 de zile (la 12 °C). Numai culturile care au fost ținute în laborator timp de cel puțin 5 săptămâni (o generație) fără probleme ar trebui folosite pentru teste.

Sunt adecvate și alte genuri din specia *Enchytraeus*, mai ales *Enchytraeus luxuriosus*. Această specie este un adevărat locuitor al solului, care a fost descrisă de curând în (65). Dacă sunt folosite alte specii de *Enchytraeus*, acestea ar trebui să fie clar identificate și ar trebui raportată justificarea pentru selectarea speciei.

Enchytraeus crypticus (Westheide și Graefe, 1992) este o specie care aparține aceluiași grup ca și *Enchytraeus luxuriosus*. Nu s-a determinat cu certitudine existența acesteia în natură, specia fiind descrisă numai în culturile de râme și în grămezile de compost (Römbke 2003). Prin urmare, cerințele ecologice inițiale ale acesteia nu sunt cunoscute. Totuși, studii de laborator recente cu diferite soluri naturale au confirmat că această specie prezintă o toleranță ridicată la proprietățile solului, cum este pH-ul și textura (Jänsch *et al.* 2005). În ultimii ani, această specie a fost deseori folosită în studii ecotoxicologice datorită ușurinței înmulțirii și testării, de exemplu Kuperman *et al.* 2003. Totuși, această specie este mică [3-12 mm; în medie 7 mm (Westheide și Müller, 1996)], iar acest fapt face ca manipularea sa să fie mult mai dificilă comparativ cu *Enchytraeus albidus*. Când se folosește această specie în locul *Enchytraeus albidus*, dimensiunea vasului de testare poate fi mai mică, dar aceasta nu este o necesitate. În plus, ar trebui avut în vedere faptul că această specie se reproduce foarte rapid, timpul său de generare fiind mai mic de 20 de zile la 20 ± 2 °C (Achazi *et al.*, 1999) și chiar mai rapid la temperaturi mai ridicate.

Enchitreidele din specia *Enchytraeus albidus* (precum și alte specii de *Enchytraeus*) pot fi înmulțite în cutii mari de plastic (de exemplu, 30 × 60 × 10 cm sau 20 × 12 × 8 cm, care este adecvată pentru creșterea viermilor de dimensiuni mici) umplute cu un amestec de sol artificial și de sol de grădină necontaminat, fără aditivi, disponibil în comerț. Trebuie evitată utilizarea compostului deoarece acesta poate conține substanțe chimice toxice, cum ar fi metale grele. Înainte de utilizare ar trebui eliminată fauna din solul pentru înmulțire prin trei congelări. De asemenea, poate fi utilizat și sol artificial, însă rata de reproducere ar putea fi mai lentă comparativ cu cea obținută în substraturile mixte. Substratul ar trebui să aibă un pH de 6,0 ± 0,5. Cultura se ține într-un incubator la temperatura de 15 ± 2 °C fără lumină. În orice caz, ar trebui evitată o temperatură mai mare de 23 °C. Solul artificial/natural ar trebui să fie umed, însă nu ud. Când solul este apăsat ușor cu mâna, ar trebui să apară numai mici picături de apă. În orice caz, ar trebui evitate condițiile anoxice (de exemplu, dacă se utilizează un capac, numărul de găuri din capac ar trebui să fie suficient de mare pentru a asigura într-o măsură suficientă schimbul de aer). Solul pentru înmulțire ar trebui să fie aerat, prin amestecare atentă, o dată pe săptămână.

▼M4

Viermii ar trebui să fie hrăniți cel puțin o dată pe săptămână *ad libitum* cu fulgi de ovăz care sunt puși într-o cavitate în suprafața solului și acoperiți cu sol. Dacă în recipient rămâne hrană de la ultima dată de alimentare, cantitatea de hrană administrată ar trebui ajustată corespunzător. Dacă pe hrana rămasă se dezvoltă ciuperci, aceasta ar trebui înlocuită cu o nouă cantitate de fulgi de ovăz. Pentru a stimula reproducerea, fulgii de ovăz pot fi suplimentați, o dată la două săptămâni, cu pudră proteică disponibilă în comerț, îmbogățită cu vitamine. După trei luni, animalele sunt transferate într-un substrat de înmulțire sau de cultură proaspăt preparat. Fulgii de ovăz, care au fost ținuți în vase închise ermetic, ar trebui autoclavați sau încălziți înainte de utilizare pentru a preveni infecțiile cu acarieni de făină (de exemplu, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) sau cu acarieni prădatori [e.g. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. După dezinfectare, hrana se macină astfel încât să poată fi presărată cu ușurință pe suprafața solului. O altă sursă de hrană posibilă este drojdia pentru panificație sau hrana pentru pești TetraMin®.

În general, condițiile de creștere sunt suficiente dacă viermii nu încearcă să părăsească substratul, se mișcă rapid prin sol, prezintă o suprafață exterioară lucioasă, fără particule de sol agățate de ea, sunt colorați mai mult sau mai puțin albicios și dacă viermii cu vârste diferite sunt vizibili. În fapt, se poate considera că viermii sunt sănătoși dacă se reproduc continuu.

Referințe bibliografice selecționate suplimentare

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999), The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005), Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species, Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003), Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX, Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003), Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review, Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992), Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida), J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996), Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology, Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

C.31. TEST PE PLANTĂ TERESTRĂ: TEST DE APARIȚIE A PLANTULELOR ȘI DE CREȘTERE A PLANTULELOR

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 208 (2006). Metodele de testare se revizuiesc periodic în lumina progreselor științifice și a aplicabilității în practica de reglementare. Prezenta metodă de testare actualizată are ca obiect evaluarea potențialelor efecte ale substanțelor chimice asupra apariției și creșterii plantulelor. Ea nu acoperă totuși efectele cronice sau efectele asupra reproducerii (adică formarea semințelor, formarea florilor, maturarea fructelor). Trebuie să se țină cont de condițiile de expunere și de proprietățile substanței chimice de testare pentru a asigura utilizarea unor metode de testare adecvate (de exemplu, atunci când se testează metale/compuși metalici, trebuie avute în vedere efectele de pH și ale contraionilor asociați) (1). Prezenta metodă de testare nu se aplică plantelor expuse la vapori de substanțe chimice. Ea se aplică testării substanțelor chimice generale, biocidelor și produselor de protecție a plantelor (cunoscute și sub denumirea de produse de uz fitosanitar sau de pesticide). Metoda a fost elaborată pe baza metodelor existente (2) (3) (4) (5) (6) (7). Au fost luate în considerare și alte referințe pertinente în materie de testare pe plante (8) (9) (10). Definițiile utilizate sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

2. Testul evaluează efectele expunerii la substanța chimică de testare aflată în sol (sau altă matrice de sol adecvată) asupra apariției plantulelor și a începutului creșterii unor plante mai înalte. Semințele se pun în contact cu solul tratat cu substanța chimică de testare, iar efectele se evaluează în general după 14-21 de zile de la apariția a 50 % dintre plantulele din grupul de control. Punctele finale măsurate sunt evaluarea vizuală a apariției plantulelor, greutatea uscată a lăstarilor (sau greutatea în stare proaspătă a lăstarilor) și, în unele cazuri, înălțimea lăstarilor, precum și o evaluare a efectelor nocive vizibile pe diferite părți ale plantei. Aceste măsurători și observații se compară cu cele efectuate pe plante de control netratate.

3. În funcție de calea de expunere așteptată, substanța chimică de testare fie se încorporează în sol (sau eventual în matricea de sol artificial), fie se aplică pe suprafața solului, ceea ce reprezintă exact potențiala cale de expunere la substanța chimică. Încorporarea în sol se realizează prin tratarea solului brut. După aplicare, solul se transferă în vase, după care se plantează în sol semințele speciei de plantă date. Aplicarea pe suprafață se realizează pe solul din vase în care au fost plantate deja semințele. Unitățile de testare (probele de control și solurile tratate plus semințele) se plasează în condiții adecvate care să favorizeze germinarea/creșterea plantelor.

4. În funcție de obiectivul studiului, testul poate fi efectuat pentru a determina curba doză-răspuns sau poate fi efectuat la o concentrație/rată unică sub forma unui test la valori-limită. Dacă valorile rezultate în urma unui test la concentrație/rată unică depășesc un anumit nivel de toxicitate (de exemplu, atunci când se observă efecte mai mari decât x %), se realizează un test de stabilire a intervalului pentru a determina limitele superioare și inferioare ale toxicității, urmat de un test la mai multe concentrații/rate pentru a genera curba doză-răspuns. O analiză statistică adecvată permite calcularea unei concentrații efective EC_x sau a unei rate efective de aplicare ER_x (de exemplu EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) pentru parametrul sau parametrii de interes cei mai sensibili. De asemenea, prezentul test permite calcularea valorilor pentru concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și pentru concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

5. Următoarele informații sunt utile pentru identificarea căii de expunere așteptate la substanța chimică și pentru proiectul testului: formula structurală, puritatea, solubilitatea în apă, solubilitatea în solvenți organici,

▼M6

coeficientul de partiție 1-octanol/apă, comportamentul de absorbție în sol, presiunea de vapori, stabilitatea chimică în apă și la lumină și biodegradabilitatea.

VALIDITATEA TESTULUI

6. Pentru ca testul să fie valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

— apariția plantulelor este de cel puțin 70 %;

— plantulele nu prezintă efecte fitotoxice vizibile (de exemplu cloroză, necroză, ofilire, deformări ale frunzelor și tulpinilor), iar plantele prezintă doar o variație normală a creșterii și morfologiei pentru respectiva specie;

— media de supraviețuire a plantulelor de control apărute este de cel puțin 90 % pe durata studiului;

— condițiile de mediu pentru o anumită specie sunt identice, iar mediile de cultură conțin aceeași cantitate de matrice de sol, mediu de susținere sau substrat din aceeași sursă.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

7. O substanță chimică de referință poate fi testată la intervale regulate pentru a verifica dacă performanța testului și răspunsul plantelor de testare în cauză, precum și condițiile de testare nu s-au modificat semnificativ în timp. O altă opțiune ar fi utilizarea măsurătorilor anterioare ale biomasei și creșterii pentru a evalua performanța sistemului de testare, în special laboratoare, și poate servi ca măsură de control al calității intralaboratoare.

DESCRIEREA METODEI

Sol natural – Substrat artificial

8. Plantele pot fi cultivate în vase conținând lut nisipos, nisip lutos sau lut argilos-nisipos care conține până la 1,5 % carbon organic (aprox. 3 % materie organică). Se poate utiliza și pământ de ghiveci din comerț sau un amestec de sol sintetic care să conțină până la 1,5 % carbon organic. Solurile argiloase nu trebuie utilizate dacă se știe că substanța chimică de testat are o afinitate mare pentru argile. Solul natural trebuie cernut în particule de 2 mm pentru a-l omogeniza și a îndepărta particulele mari. Trebuie raportate tipul și textura, % de carbon organic, pH-ul și conținutul de sare drept conductivitate electronică a solului final preparat. Solul trebuie clasificat în conformitate cu o schemă de clasificare standard (11). Solul poate fi pasteurizat sau tratat termic pentru a reduce efectul patogenilor din sol.

9. Solul natural poate complica interpretarea rezultatelor și poate crește variabilitatea din cauza proprietăților fizice/chimice variate și a populațiilor microbiene. În schimb, aceste variabile modifică capacitatea de reținere a umidității, capacitatea de a crea legături chimice, aerarea și conținutul de nutrienți și oligoelemente. Pe lângă variația acestor factori fizici, va exista și o variație a proprietăților chimice cum ar fi pH-ul și potențialul redox, care poate afecta biodisponibilitatea substanței chimice de testare (12) (13) (14).

10. În general, substraturile artificiale nu se utilizează pentru testarea produselor de protecție a plantelor, dar pot fi utile pentru testarea de substanțe chimice generale sau atunci când se dorește să se reducă la minimum variabilitatea solurilor naturale și să se amelioreze comparabilitatea rezultatelor testului. Substraturile utilizate trebuie să fie compuse din materiale inerte care să reducă la minimum interacțiunea cu substanța chimică de testare, cu solventul purtător sau cu ambele. S-a demonstrat că nisipul cuarțos spălat

▼M6

cu acid, lâna minerală și bilele de sticlă (de exemplu, cu diametru cuprins între 0,35 și 0,85 mm) reprezintă materiale inerte adecvate care absorb foarte puțin substanța chimică de testare (15), asigurând disponibilitatea maximală a substanței chimice pentru plantule prin absorbție radiculară. Printre substraturile necorespunzătoare se numără vermiculitul, perlitul sau alte materiale puternic absorbante. Aportul de nutrienți favorabili creșterii plantelor va asigura faptul că plantele nu sunt stresate din cauza carențelor nutritive și, dacă este posibil, acest lucru trebuie evaluat prin analize chimice sau prin inspecții vizuale ale plantelor de control.

Criterii pentru selectarea speciei de testare

11. Specia selectată trebuie să aibă o răspândire rezonabilă, de exemplu, având în vedere diversitatea taxonomică în regnul vegetal, distribuția, abundența, caracteristicile ciclului de viață specifice speciei și regiunea de ocurență naturală, pentru a dezvolta o serie de răspunsuri (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Pentru selectare, trebuie avute în vedere următoarele caracteristici ale posibilelor specii de testare:

— speciile au semințe uniforme care sunt ușor disponibile la surse de semințe standard fiabile și care produc o germinare regulată, fiabilă și uniformă, precum și o creștere uniformă a plantulelor;

— planta este adaptată la testele de laborator și poate genera rezultate fiabile și reproductibile în cadrul centrelor de testare și între centrele de testare;

— sensibilitatea speciei testate trebuie să corespundă răspunsurilor plantelor care se găsesc în mediul expus la substanța chimică;

— au fost utilizate într-o anumită măsură în teste anterioare de stabilire a toxicității, iar utilizarea lor, de exemplu, în teste biologice ale erbicidelor, depistarea metalelor grele, teste de stres salin sau mineral sau studii de alelopatie indică sensibilitatea la o gamă largă de agenți stresanți;

— sunt compatibile cu condițiile de creștere ale metodei de testare;

— îndeplinesc criteriile de validitate ale testului.

Unele dintre speciile de testare cele mai utilizate în trecut sunt enumerate în apendicele 2, iar eventualele specii necultivate sunt enumerate în apendicele 3.

12. Numărul de specii care trebuie testat depinde de cerințele de reglementare relevante și, prin urmare, nu este specificat în prezenta metodă de testare.

Aplicarea substanței chimice de testare

13. Substanța chimică trebuie aplicată într-un purtător adecvat (de exemplu, apă, acetonă, etanol, polietilenglicol, gumă arabică, nisip). Pot fi testate și amestecurile (produse formulate sau formule) care conțin ingrediente active și diverși adjuvanți.

Încorporarea în sol/substratul artificial

14. Substanțele chimice care sunt solubile în apă sau în suspensie în apă pot fi adăugate în apă, iar soluția se amestecă apoi cu sol, utilizând un dispozitiv de amestecare adecvat. Acest tip de test poate fi potrivit în cazul în care expunerea la substanța chimică se face prin sol sau apă interstițială din sol și dacă există riscuri de absorbție radiculară. Capacitatea solului de reținere a apei nu trebuie depășită prin adăugarea substanței chimice de testare. Volumul de apă adăugat trebuie să fie identic pentru fiecare concentrație de testare, însă trebuie să fie limitat pentru a împiedica aglomerarea solului.

▼M6

15. Substanțele chimice cu solubilitate scăzută în apă trebuie dizolvate într-un solvent volatil adecvat (de exemplu acetonă, etanol) și amestecate cu nisip. Apoi solventul poate fi eliminat din nisip utilizând un curent de aer și amestecând continuu nisipul. Nisipul tratat se amestecă cu solul experimental. Se pregătește o a doua probă de control care trebuie să conțină numai nisip și solvent. La toate nivelurile de tratament și în a doua probă de control se adaugă cantități egale de nisip, cu solvent amestecat și eliminat. Pentru substanțele chimice de testare solide insolubile, se amestecă sol uscat cu substanța chimică utilizând un dispozitiv de amestecare adecvat. Ulterior, solul se adaugă în vase, iar semințele se plantează imediat.

16. Atunci când în loc de sol se utilizează substrat artificial, substanțele chimice care sunt solubile în apă pot fi dizolvate în soluția nutritivă chiar înainte de începerea testului. Substanțele chimice care nu sunt solubile în apă, dar care pot fi puse în suspensie în apă cu ajutorul unui solvent purtător trebuie adăugate împreună cu purtătorul în soluția nutritivă. Substanțele chimice insolubile în apă, pentru care nu există niciun purtător netoxic solubil în apă, trebuie dizolvate într-un solvent volatil adecvat. Soluția se amestecă cu nisip sau bile de sticlă, se introduce într-un aparat rotativ cu vacuum și se evaporă, lăsând un strat uniform de substanță chimică pe nisip sau pe bile. O parte cântărită de bile se extrage cu ajutorul aceluiași solvent organic, iar substanța chimică se analizează înainte de umplerea vaselor.

Aplicarea la suprafață

17. În cazul produselor de protecție a plantelor, aplicarea substanței chimice de testare se efectuează adesea prin pulverizarea suprafeței solului cu soluția de testare. Modelul și capacitatea tuturor echipamentelor utilizate pentru derularea testului, inclusiv ale echipamentelor utilizate pentru prepararea și administrarea substanței chimice de testare, trebuie să permită efectuarea cu precizie a testului și obținerea unei acoperiri reproductibile. Acoperirea trebuie să fie uniformă pe suprafețele de sol. Trebuie acordată atenție pentru a evita eventualele interacțiuni prin absorbție sau reacție dintre substanțele chimice și echipamente (de exemplu, tuburi de plastic și substanțe chimice lipofile sau piese și elemente din oțel). Substanța chimică de testare se pulverizează pe suprafața solului simulând aplicările obișnuite cu cisternă de pulverizare. În general volumele pulverizate trebuie să se încadreze în intervalul utilizat în practica agricolă obișnuită, iar aceste volume (cantitatea de apă etc.) trebuie raportate. Pentru a asigura o acoperire uniformă a suprafeței solului trebuie ales tipul de duză. Dacă se aplică solvenți și purtători, trebuie stabilit un al doilea grup de plante de control care să primească doar solventul/purtătorul. Acest lucru nu este necesar pentru produsele de protecție a plantelor care sunt testate sub formă de formule.

Verificarea concentrației/ratei de substanță chimică de testare

18. Concentrațiile/ratele de aplicare trebuie confirmate de o verificare analitică adecvată. Pentru substanțele chimice solubile, verificarea tuturor concentrațiilor/ratelor de testare poate fi confirmată prin analiza soluției de testare având cea mai mare concentrație utilizată în cadrul testului cu documentația privind diluarea ulterioară și utilizarea de echipamente de aplicare calibrate (de exemplu, vase analitice calibrate din sticlă, calibrarea echipamentelor de aplicare prin pulverizare). Pentru substanțele chimice insolubile, verificarea materialului compus trebuie făcută cu greutățile de substanță chimică adăugată în sol. Dacă este necesară demonstrarea omogenității, poate fi necesară analiza solului.

PROCEDURA

Proiectul testului

19. Se plantează în vase semințe din aceeași specie. Numărul de semințe plantate în fiecare vas depinde de specie, de dimensiunea vasului și de durata testului. Numărul de plante din fiecare vas trebuie să asigure condiții de creștere adecvate și să evite aglomerarea pe durata testului.

▼**M6**

Densitatea maximă a plantelor ar fi de aproximativ 3-10 semințe la 100 cm^2 în funcție de mărimea semințelor. De exemplu, se recomandă una sau două plante de porumb, soia, pătlăgea roșie, castravete sau sfeclă de zahăr la fiecare recipient de 15 cm, trei plante de rapiță sau mazăre la fiecare recipient de 15 cm și 5-10 plante de ceapă, grâu sau alte plante cu semințe mici la fiecare recipient de 15 cm. Numărul de semințe și de vase duplicat (duplicatul corespunde unui vas, prin urmare plantele din același vas nu constituie duplicate) ar trebui să fie adecvat pentru analiza statistică optimă (21). Trebuie remarcat faptul că variabilitatea va fi mai mare la speciile de testare care utilizează mai puține semințe mai mari în fiecare vas (duplicat) decât la speciile de testare unde este posibilă utilizarea unui număr mai mare de semințe mici în fiecare vas. Prin plantarea unui număr egal de semințe în fiecare vas această variabilitate poate fi redusă la minimum.

20. Grupurile de control se utilizează pentru a asigura faptul că efectele observate sunt asociate sau se atribuie numai expunerii la substanța chimică de testare. Grupul de control adecvat trebuie să fie identic din toate privințele cu grupul de testare, cu excepția expunerii la substanța chimică de testare. În cadrul unui test dat, toate plantele de testare, inclusiv probele de control, trebuie să provină din aceeași sursă. Pentru a preveni deviațiile, este necesară repartiția aleatorie a vaselor de testare și a vaselor de control.

21. Trebuie evitate semințele acoperite de insecticid sau fungicid (adică semințe „îmbrăcate”). Cu toate acestea, utilizarea anumitor fungicide cu contact nesistemic (de exemplu captan, thiram) este permisă de unele autorități de reglementare (22). Dacă patogenii proveniți din semințe reprezintă o problemă, semințele trebuie înmuiate pentru scurt timp într-o soluție de hipoclorit slabă cu concentrație de 5 %, apoi clătite bine sub jet de apă și uscate. Nu se permite niciun alt tratament curativ cu alte produse de protecție a plantelor.

Condițiile de testare

22. Condițiile de testare trebuie să fie apropiate de condițiile necesare pentru creșterea normală a speciilor și soiurilor testate (în apendicele 4 sunt prezentate exemple de condiții de testare). Plantele emergente trebuie întreținute prin bune practici horticole în camere, fitotroane sau sere cu mediu controlat. Când se utilizează instalații de cultivare, printre aceste practici se numără verificarea și consemnarea cu o frecvență adecvată (de exemplu zilnică) a temperaturii, umidității, concentrației de dioxid de carbon, luminii (intensitatea, lungimea undei, radiația activă fotosintetică) și a perioadei de lumină, mijloace de irigare etc. pentru a asigura o bună creștere a plantelor estimată prin observarea plantelor de control din specia selectată. Temperaturile din sere trebuie controlate prin sisteme de ventilare, încălzire și/sau răcire. Pentru testarea în sere se recomandă în general următoarele condiții:

— temperatură: 22 °C ± 10 °C;

— umiditate: 70 % ± 25 %;

— fotoperioadă: minimum 16 ore de lumină;

— intensitate luminoasă: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Ar putea fi necesară o iluminare suplimentară în cazul în care intensitatea scade sub 200 $\mu E/m^2/s$, lungime de undă de 400-700 nm, cu excepția anumitor specii pentru care cerințele de lumină sunt mai scăzute.

Condițiile de mediu trebuie monitorizate și raportate pe parcursul studiului. Plantele trebuie cultivate în vase din plastic neporos sau în vase emailate, cu o tavă sau farfurie dedesubt. Vasele pot fi repoziționate periodic pentru a

▼M6

reduce la minimum variabilitatea creșterii în rândul plantelor (din cauza diferenței condițiilor de testare din instalațiile de cultivare). Vasele trebuie să fie suficient de mari pentru a permite creșterea normală.

23. Pentru a menține o bună vigoare a plantelor, nutrienții solului pot fi suplimentați. Nevoia și momentul adăugării nutrienților suplimentari pot fi determinate prin observarea plantelor de control. Se recomandă alimentarea cu apă prin partea inferioară a recipientelor de testare (de exemplu utilizând meșe din fibră de sticlă). Cu toate acestea, se poate efectua o irigare inițială prin partea superioară pentru a stimula germinarea semințelor și, pentru aplicarea la suprafața solului, aceasta facilitează pătrunderea substanței chimice în sol.

24. Condițiile de cultivare specifice trebuie să fie adecvate pentru speciile testate și pentru substanța chimică de testare supusă studiului. Plantele de control și plantele tratate trebuie ținute în condiții de mediu identice. Cu toate acestea, trebuie luate măsuri adecvate pentru a împiedica expunerea încrucișată (de exemplu a substanțelor chimice volatile) între diferite tratamente și a probelor de control la substanța chimică de testare.

Testarea la concentrație/rată unică

25. Pentru a determina concentrația/rata adecvată de substanță chimică de testare pentru efectuarea unui test la concentrație/rată unică (de simulare/la valori-limită), trebuie avută în vedere o serie de factori. Pentru substanțele chimice generale, printre acești factori se numără proprietățile fizice/chimice ale substanței chimice. Pentru produsele de protecție a plantelor, trebuie avute în vedere proprietățile fizice/chimice și modelul de utilizare ale substanței chimice de testare, concentrația sau rata de aplicare maximă, numărul de aplicări pe sezon și/sau persistența substanței chimice de testat. Pentru a stabili dacă o substanță chimică generală prezintă proprietăți fitotoxice, ar putea fi adecvată testarea unui nivel maxim de 1 000 mg/kg de sol uscat.

Testul de stabilire a intervalului

26. Atunci când este necesar, se poate realiza un test de stabilire a intervalului pentru a furniza orientări privind concentrațiile/ratele care vor fi testate în cadrul studiului doză-răspuns final. Pentru testul de stabilire a intervalului, intervalele dintre concentrațiile/ratele de testare trebuie să fie mari (de exemplu 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg sol uscat). Pentru produsele de protecție a plantelor, concentrațiile/ratele ar putea fi bazate pe concentrația sau rata de aplicare recomandată sau maximă, de exemplu 1/100, 1/10, 1/1 din concentrația sau rata de aplicare recomandată/maximă.

Testarea la mai multe concentrații/rate

27. Scopul testului la mai multe concentrații/rate este de a stabili o relație doză-răspuns și de a determina o valoare EC_x sau ER_x legată de apariție, biomasă și/sau efectele vizuale în comparație cu probele de control neexpuse, conform cerințelor autorităților de reglementare.

28. Numărul de concentrații sau rate și intervalul dintre ele trebuie să fie suficiente pentru a genera o relație doză-răspuns și o ecuație de regresie fiabile și pentru a estima EC_x sau ER_x. Concentrațiile/ratele selectate trebuie să încadreze valorile EC_x sau ER_x care trebuie determinate. De exemplu, dacă este necesară o valoare EC_{50}, ar fi de preferat realizarea testului la rate care produc un efect cuprins între 20 și 80 %. Numărul recomandat de concentrații/rate de testare pentru a obține acest rezultat este de cel puțin cinci în serie geometrică plus proba de control netratată și distanțate de un factor de cel mult trei. Pentru fiecare grup suspus tratamentului și fiecare grup de

▼M6

control, numărul de probe duplicat trebuie să fie de cel puțin patru, iar numărul total de semințe trebuie să fie de cel puțin 20. În cazul anumitor plante având o viteză scăzută de germinare sau caracteristici de creștere variabile, ar putea fi necesare mai multe probe duplicat pentru a crește puterea statistică a testului. Dacă se utilizează un număr mai mare de concentrații/rate de testare, numărul de probe duplicat poate fi redus. Dacă trebuie estimată NOEC, ar putea fi necesare mai multe probe duplicat pentru a obține puterea statistică dorită (23).

Observații

29. Pe parcursul perioadei de observație, adică 14-21 de zile de la apariția a 50 % dintre plantele de control (și a plantelor de control cu solvent, dacă este cazul), plantele se examinează frecvent (cel puțin săptămânal și, dacă este posibil, zilnic) pentru a observa apariția, fitotoxicitatea vizuală și mortalitatea. La finalul testului, se măsoară și se consemnează procentajul de apariție și biomasa plantelor supraviețuitoare, precum și efectele nocive vizibile asupra diferitor părți ale plantei. Printre efectele nocive se numără anomaliile legate de aspectul plantulelor apărute, oprirea din creștere, cloroza, decolorarea, mortalitatea și efectele asupra dezvoltării plantelor. Biomasa finală poate fi măsurată utilizând greutatea uscată medie finală a lăstarilor plantelor supraviețuitoare, prin recoltarea lăstarilor de la suprafața solului și uscarea lor până la obținerea unei greutăți constante la 60 °C. Alternativ, biomasa finală se poate măsura utilizând greutatea în stare proaspătă a lăstarilor. Înălțimea lăstarilor poate reprezenta un alt punct final, dacă acest lucru este solicitat de autoritățile de reglementare. Pentru a evalua răspunsurile toxice observabile, ar trebui utilizat un sistem de notare uniformă a leziunilor vizibile. Exemple de efectuare a evaluărilor vizuale calitative și cantitative sunt furnizate în referințele (23) (24).

DATE ȘI RAPORT

Analiza statistică

Testul la concentrație/rată unică

30. Datele pentru fiecare specie de plante trebuie analizate cu ajutorul unei metode statistice adecvate (21). Trebuie să se raporteze nivelul efectului la concentrația/rata de testare sau incapacitatea de a obține un efect dat la concentrația/rata de testare (de exemplu <*x* % efect observat la concentrația sau rata *y*).

Testul la mai multe concentrații/rate

31. O relație doză-răspuns se stabilește pe baza unei ecuații de regresie. Pot fi utilizate diferite modele: de exemplu, pentru estimarea EC_x sau ER_x (de exemplu EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) și a limitelor lor de încredere pentru apariție sub formă de date binare, pot fi adecvate metodele logit, probit, Weibull, Spearman-Karber, Spearman-Karber simplificată. Creșterea plantulelor (greutate sau înălțime) ca puncte finale continue EC_x sau ER_x și limitele sale de încredere pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată [de exemplu analiza de regresie neliniară Bruce-Versteeg (25)]. În măsura posibilului, R^2 trebuie să fie 0,7 sau mai mare pentru speciile cele mai sensibile, iar concentrațiile/ratele de testare cuprind efectele de la 20 % la 80 %. Dacă trebuie estimată NOEC, este de preferat aplicarea unor teste statistice puternice, care trebuie selectate pe baza distribuției datelor (21) (26).

Raportul de testare

32. Raportul de testare trebuie să prezinte rezultatele studiilor, precum și o descriere detaliată a condițiilor de testare, o discuție amplă a rezultatelor, analiza datelor și concluziile trase din analiză. Trebuie furnizate un rezumat sub formă de tabel și o sinteză a rezultatelor. Raportul trebuie să includă următoarele:

▼**M6**

Substanța chimică de testare:

— datele de identificare a substanței chimice, proprietățile relevante ale substanței chimice testate (de exemplu log P_{ow}, solubilitatea în apă, presiunea de vapori și informații privind evoluția și comportamentul în mediu, dacă sunt disponibile);

— detalii privind prepararea soluției de testare și verificarea concentrațiilor de testare, astfel cum se specifică la punctul 18.

Speciile de testare:

— detalii privind organismul de testare: specia/soiul, familia de plante, denumirile științifice și comune, istoricul seminței cât mai detaliat posibil (adică numele furnizorului, procentajul de germinare, clasa de mărime a seminței, numărul seriei sau lotului, anul seminței sau sezonul de creștere în care a fost colectată, data evaluării germinării), fiabilitatea etc.;

— numărul de specii monocotiledonate și dicotiledonate testate;

— argumentarea alegerii speciei;

— descrierea depozitării, tratării și întreținerii semințelor.

Condițiile de testare:

— instalația de testare (de exemplu, cameră de cultivare, fitotron și seră);

— descrierea sistemului de testare (de exemplu, dimensiunile vaselor, materialul vaselor și cantitățile de sol);

— caracteristicile solului (textura sau tipul solului, distribuția și clasificarea particulelor de sol, proprietățile fizice și chimice, inclusiv % de materie organică, % de carbon organic și pH-ul)

— prepararea solului/substratului (de exemplu, sol, sol artificial, nisip și altele) înainte de test;

— descrierea mediului nutritiv, dacă a fost utilizat;

— aplicarea substanței chimice de testare: descrierea metodei de aplicare, descrierea echipamentelor, procentajele de expunere și volumele, inclusiv verificarea substanței chimice, descrierea metodei de calibrare și descrierea condițiilor de mediu în timpul aplicării;

— condițiile de creștere: intensitatea luminoasă (de exemplu RAF, radiația activă fotosintetică), fotoperioada, temperaturile max./min., programul și metoda de irigare, fertilizarea;

— numărul de semințe din fiecare vas, numărul de plante per doză, numărul de duplicate (vase) per rată de expunere;

— tipul și numărul de probe de control (probe de control negative și/sau pozitive, probe de control cu solvent, dacă au fost utilizate);

— durata testului.

Rezultate:

— tabel cu toate punctele finale pentru fiecare duplicat, concentrația/rata de testare și specia;

— numărul și procentajul de apariție în comparație cu probele de control;

— măsurătorile biomasei (greutatea uscată și greutatea în stare proaspătă a lăstarilor) plantelor sub formă de procentaj din probele de control;

▼M6

— înălțimea lăstarilor plantei sub formă de procentaj din probele de control, dacă a fost măsurată;

— procentajul de leziuni vizuale și descrierea calitativă și cantitativă a leziunilor vizuale (cloroză, necroză, ofilire, deformarea frunzelor și tulpinilor, precum și orice lipsă a efectelor) provocate de substanța chimică de testare în comparație cu plantele de control;

— descrierea scalei de evaluare utilizate pentru aprecierea leziunilor vizuale, dacă se furnizează o evaluare vizuală;

— pentru studiile la rată unică, procentajul de leziuni trebuie raportat;

— valorile EC_x sau ER_x (de exemplu EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) și limitele de încredere aferente. Dacă se efectuează o analiză a regresiei, trebuie furnizate eroarea standard pentru ecuația de regresie și eroarea standard pentru estimarea parametrilor individuali (de exemplu pantă, intercepție);

— valorile NOEC (și LOEC), dacă au fost calculate;

— descrierea procedurilor statistice și a ipotezelor utilizate;

— reprezentarea grafică a acestor date și a relației doză-răspuns pentru specia testată.

Abaterile de la procedurile descrise în cadrul prezentei metode de testare și toate evenimentele neobișnuite din timpul testului.

BIBLIOGRAFIE

(1) Schrader G., Metge K., și Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. și Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., și Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzens-chutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., și Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. și Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. și Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C. și Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. și Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. și Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OCDE (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. și Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. și G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. și Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. și Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Capitolul C.33 al prezentei anexe: Test de reproducere a râmelor (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼M6

Apendicele 1

Definiții

„Ingredient activ (i.a.) [sau substanță activă (s.a.)]” înseamnă un material destinat să exercite un anumit efect biologic (de exemplu, controlul insectelor, controlul bolilor plantelor, controlul buruienilor în zona tratată), cunoscut și ca ingredient activ sau substanță activă de puritate tehnică.

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„Produse de protecție a plantelor ori produse de uz fitosanitar sau pesticide” înseamnă materiale cu o anumită activitate biologică utilizate intenționat pentru protejarea culturilor împotriva dăunătorilor (de exemplu, boli criptogamice, insecte și plante competitive).

„EC_x. concentrația efectivă x % sau ER_x. rata efectivă x %” înseamnă concentrația sau rata care are ca rezultat o schimbare sau o modificare nedorită de x % din punctul final de testare măsurat în raport cu proba de control (de exemplu reducerea cu 25 % sau 50 % a apariției plantulelor, a greutății lăstarilor, a numărului final de plante prezente sau creșterea leziunilor vizuale constituie o EC_{25}/ER_{25} sau, respectiv, o EC_{50}/ER_{50}).

„Apariție” înseamnă apariția coleoptilului sau a cotiledonului deasupra suprafeței solului.

„Formulă” înseamnă produsul formulat comercial care conține substanța activă (ingredientul activ), cunoscut și sub denumirea de preparat final ([1]) sau produs final tipic.

„LOEC (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect)” înseamnă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare pentru care este observat un efect. În prezentul test, concentrația corespunzătoare LOEC are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control și este mai mare decât valoarea NOEC.

„Plante nevizate” înseamnă plantele care se află în afara zonei unde se află plantele vizate. Pentru produsele de protecție a plantelor, acest termen se referă în general la plantele care se află în afara zonei supuse tratamentului.

„NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect)” înseamnă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare la care nu se observă niciun efect. În prezentul test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„Fitotoxicitate” înseamnă devieri nocive (conform evaluărilor măsurate și vizuale) de la aspectul și creșterea normale ale plantelor ca răspuns la o substanță chimică dată.

„Duplicat” înseamnă unitatea experimentală care reprezintă grupul de control și/sau grupul supus tratamentului. În prezentele studii, duplicatul este reprezentat de un vas.

„Evaluare vizuală” înseamnă evaluarea defectelor vizuale pe baza observațiilor privind postura, vigoarea, malformațiile, cloroza, necroza și aspectul general al plantei în comparație cu o plantă de control.

„Substanță chimică de testare” orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

([1]) Preparat final: Produsul formulat care conține substanța chimică activă (ingredientul activ) vândut în comerț.

▼**M6**

Apendicele 2

Listă de specii utilizate în trecut în testele pe plante

Familia	Specia	Denumirea comună
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Morcov
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Floarea-soarelui
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Salată verde
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Muștar alb
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Varză chinezească
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Rapiță
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Varză
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Nap
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Creson de grădină
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Ridiche
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Sfeclă de zahăr
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Castravete
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soia
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Fasole mung
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Fasole pitică, fasole franțuzească, fasole de grădină
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Mazăre
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Schinduf
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Ghizdei
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Trifoi roșu
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Măzăriche
Linaceae	*Linum usitatissimum*	In
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Hrișcă
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Pătlăgea roșie

▼**M6**

Familia	Specia	Denumirea comună
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amarylladaceae)	*Allium cepa*	Ceapă
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Ovăz
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Orz
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Zizanie
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Orez
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Secară
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Sorg
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Grâu
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Porumb

▼M6

Apendicele 3

Listă de specii necultivate potențiale

Specii potențiale potrivit OCDE pentru testarea toxicității la plante

Notă: Tabelul următor pune la dispoziție informații pentru 52 de specii necultivate (referințele sunt prezentate între paranteze pentru fiecare intrare). Ratele de apariție furnizate sunt extrase din literatura de specialitate publicată și sunt puse la dispoziție doar cu titlu de orientare generală. Experiența individuală poate varia în funcție de sursa semințelor și de alți factori.

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea seminței (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
APIACEAE *Torilis japónica* (Hațmațuchiul măgarului)	A, B zone perturbate, marginea tufișurilor, pășuni (16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratificare rece (7, 14, 18, 19) maturarea poate fi necesară (19) germinare inhibată de întuneric (1, 19) niciun tratament special (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Părăluță)	P pășuni și fânețe, terenuri arabile, peluze (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	germinare neafectată de iradiație (18, 19) fără tratamente speciale (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Albăstrea)	A câmpuri, marginea drumurilor, habitate deschise (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	fără tratamente speciale (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Țintaură)	P câmpuri, marginea drumurilor, habitate deschise (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	maturarea poate fi necesară (18, 19) germinare inhibată de întuneric (19) fără tratamente speciale (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (Iarbă mare)	P locuri umede, perturbate (16)	1-1.3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		fără tratamente speciale (4)	POST (4)	A, F	

02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 2040

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea seminței (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Leontodon hispidus (Potcapul-călugărului)	P câmpuri, marginea drumurilor, zone perturbate (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (17, 18, 19) fără tratamente speciale (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Pălăria soarelui)	B, P perturbat (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	fără tratamente speciale (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Sânziană)	P pășuni, zone deschise (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	se amestecă cu o parte egală de nisip și se înmoaie în 500ppm de GA timp de 24 de ore (11) fără tratamente speciale (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Scaiete comun)	A câmpuri, habitate deschise (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		germinarea poate fi inhibată de întuneric (1) se înmoaie în apă caldă timp de 12 ore (29)	PRE și POST (31)	A	
Xanthium spinosum (Ghimpe)	A habitate deschise (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		scarificare (14) fără tratamente speciale (6)	PRE și POST (6)	A	
Xanthium strumarium (Scaietele popii)	A câmpuri, habitate deschise (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		fără tratamente speciale (6, 14, 21)	PRE și POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Stupitul-cucului)	P câmpuri, marginea drumurilor, peluze (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (18, 19) fără tratamente speciale (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea seminței (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (Floarea-cucului)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	maturarea poate fi necesară (18) fără tratamente speciale (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Spanac sălbatic)	A marginea câmpurilor, zone perturbate (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	tratamentul diferă în funcție de culoarea semințelor (19) stagnarea creșterii în depozitare uscată (19) germinare inhibată de întuneric (1, 18, 19) stratificare rece (18) fără tratamente speciale (14, 34)	PRE și POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Sunătoare)	P câmpuri, terenuri arabile, habitate deschise (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (1, 18, 19) fără tratamente speciale (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Rochița-rândunicii)	A marginea drumurilor, habitate deschise, lanuri de porumb (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	germinare neafectată de iradiație (1) fără tratamente speciale (6, 21)	PRE și POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Căprișor)	P terenuri arabile, pășuni, marginea drumurilor (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	germinare inhibată de întuneric (1) fără tratamente speciale (6, 10, 14)	PRE și POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Ghizdei)	P zone ierboase, marginea drumurilor, habitate deschise (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarificare (14, 19) germinare neafectată de iradiație (18, 19) fără tratamente speciale (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea semințelor (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Senna obtusifolia (Senna chinezească)	A păduri umede (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		semințele se înmoaie în apă timp de 24 de ore (9) scarificare (14) viabilitatea semințelor diferă în funcție de culoare (1) fără tratamente speciale (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (Cânepă)	A sol aluvial (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		semințele se înmoaie în apă timp de 24 de ore (9) germinare neafectată de iradiație (1) fără tratamente speciale (21)	PRE și POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Trifoi roșu)	P câmpuri, marginea drumurilor, terenuri arabile (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	scarificare (14, 18) poate necesita maturare (19) germinare neafectată de iradiație (1, 19) fără tratamente speciale (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Talpa-gâștei)	P zone deschise (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		fără tratamente speciale (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (Mentă comună)	P zone umede (16)	2,21 (4)		0 (4)		fără tratamente speciale (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (Cătușnică)	P zone perturbate (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		fără tratamente speciale (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea semințelor (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Prunella vulgaris (Busuioc-sălbatic)	P terenuri arabile, zone ierboase, locuri perturbate (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (18, 19) germinare mai bună cu semințe mai mari (1) fără tratamente speciale (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Vindecea)	P pășuni și fânețe, marginea câmpurilor (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	fără tratamente speciale (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (Pristolnic)	A câmpuri, habitate deschise (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarificare (14) fără tratamente speciale (5, 10, 21)	PRE și POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Sida spinoasă)	A câmpuri, marginea drumurilor (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		scarificare (14) germinare neafectată de iradiație (1) fără tratamente speciale (6, 21)	PRE și POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Mac)	A câmpuri, terenuri arabile, locuri perturbate (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratificare rece și scarificare (1, 19, 32) fără tratamente speciale (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Păiuș)	peluze, pășuni (16)	0,07 (14)	L > D (HO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	germinare inhibată de întuneric (1, 17-19) fără tratamente speciale (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Coada-vulpii)	A câmpuri, habitate deschise (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarificare (14) se tratează cu 101 mg/l KNO3 (14) stratificare caldă (1) germinare inhibată de întuneric (1) fără tratamente speciale (34)	PRE și POST (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea seminței (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Avena fatua (Ovăz sălbatic)	A zone cultivate, habitate deschise (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	scarificare (7, 32) întunericul inhibă germinarea (1) stratificare rece (1, 18) fără tratamente speciale (6, 10, 14)	PRE și POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Obsigă)	A câmpuri, marginea drumurilor, terenuri arabile (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		perioadă de maturare (1, 7, 32) germinare inhibată de lumină (1) fără tratamente speciale (14)	PRE și POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Pieptănariță)	P câmpuri, marginea drumurilor, habitate deschise (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	germinare neafectată de iradiație (19) fără tratamente speciale (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Rouriță sanguinee)	A câmpuri, peluze, habitate deschise (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	scarificare, stratificare rece și maturare (1, 7, 14, 32) se tratează cu 101 mg/l KNO3 (14) germinare inhibată de întuneric (1) fără tratamente speciale (21)	PRE și POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Costrei)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		scarificare (7, 32) germinare neafectată de iradiație (1) fără tratamente speciale (3, 14, 21)	PRE și POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Orzișor canadian)	P riveran, locuri perturbate (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	fără tratamente speciale (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Păiuș)	P câmpuri, zone umede (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	fără tratamente speciale (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea semințelor (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Hordeum pusillum (Orz pitic)	A pășuni, marginea drumurilor, habitate deschise (16)	3,28 (14)				stratificare caldă (1) germinare neafectată de iradiație (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense (Timoftică)	P pășuni, terenuri arabile, locuri perturbate (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	germinare inhibată de întuneric (19) germinare neafectată de iradiație (17) fără tratamente speciale (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Hrișcă urcătoare)	A habitate deschise, marginea drumurilor (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratificare rece timp de 4-8 săptămâni (1, 2, 4, 20, 29) germinare neafectată de iradiație (1)	PRE și POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Iarbă roșie)	A sol umed (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	germinare neafectată de iradiație (1) germinare inhibată de întuneric (18) stratificare rece (1) fără tratamente speciale (5)	PRE și POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (Troscot de Pennsylvania)	A câmpuri, habitate deschise (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		stratificare rece timp de 4 săpt. la 0-5 °C (1, 29) germinare inhibată de întuneric (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Troscot)	A zone perturbate, terenuri arabile (16, 19)	2,1-2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	scarificare, stratificare rece, tratament cu GA (14) stratificare rece, maturare (17-19) germinare inhibată de întuneric (19) fără tratamente speciale (13)	POST (13)	A	32

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea semințelor (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Rumex crispus (Dragavei)	P terenuri arabile, marginea drumurilor, zone deschise (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	germinare inhibată de întuneric (18, 19) maturarea poate fi necesară (18) fără tratamente speciale (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Scânteiuță)	A terenuri arabile, zone deschise, locuri perturbate (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	stratificare rece, tratament cu GA (1,14, 18, 19, 32) germinarea necesită lumină (1) fără tratamente speciale (2, 4)	POST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Piciorul-cocoșului)	P terenuri arabile, marginea drumurilor, zone deschise (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41-56 (19, 29)	fără tratamente speciale (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Cerențel)	P marginea tufișurilor, zone umede (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (18, 19) stratificare caldă (1) fără tratamente speciale (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Turiță)	A terenuri arabile, zone umede, locuri perturbate (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratificare rece (1, 18, 19) germinare neafectată de iradiație (18, 19) germinare inhibată de lumină (1) fără tratamente speciale (6, 14)	PRE și POST (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILIA Denumirea botanică a speciei (denumirea comună în română)	Durata de viață ([1]) și habitatul	Greutatea seminței (mg)	Fotoperioada pentru germinare sau creștere ([2])	Adâncimea de plantare (mm) ([3])	Timpul de germinare (zile) ([4])	Tratamente speciale ([5])	Test de toxicitate ([6])	Furnizori de semințe ([7])	Alte referințe ([8])
Galium mollugo (Sânziană albă)	P maluri cu tufișuri, zone deschise (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		fără tratamente speciale (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Degețel roșu)	B, P marginea tufișurilor, zone deschise (16, 19)	0,1-0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (1, 17-19) fără tratamente speciale (4, 22-26)	POST (4, 22 – 26)	D, G, F	
Veronica persica (Ventrilică)	A terenuri arabile, zone deschise, locuri perturbate (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	germinare inhibată de întuneric (18, 19) stratificare rece (18) fără tratamente speciale (14)	PRE și POST (28)	A	32

([1]) A = anuale, B = bienale, P = perene.
([2]) Referințele 11, 14 și 33 se referă la proporția de lumină (L) și de întuneric (D) necesară pentru inducerea germinării semințelor. Referințele 3, 6, 9, 10, 13, 20 se referă la condițiile de cultivare în sere.
([3]) 0 mm indică faptul că semințele au fost plantate la suprafața solului sau că semințele au nevoie de lumină pentru a germina.
([4]) Numerele furnizate reprezintă numărul de zile în care un procentaj de semințe au germinat conform referinței furnizate, de exemplu germinare de 3 zile (50 %) (referința 19).
([5]) Durata maturării și/sau a stratificării nu este întotdeauna disponibilă. Cu excepția cerințelor de tratament la rece, condițiile de temperatură nu sunt specificate, deoarece în testarea în sere controlul asupra temperaturii este limitat. Majoritatea semințelor vor germina în condiții de fluctuație a temperaturilor din sere.
([6]) Indică faptul că specia a fost utilizată într-un test de toxicitate pe plante preapariție (PRE) și/sau postapariție (POST) implicând erbicide.
([7]) Furnizează exemple de furnizori comerciali de semințe.
([8]) Furnizează două referințe alternative care au fost consultate.

▼**M6**

Furnizori de semințe citați

Identificarea furnizorului	Informații despre furnizor
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ANGLIA +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 SUA (727) 344 – 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 – 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 SUA (303) 431 – 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 SUA (800) 873 – 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ANGLIA +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

BIBLIOGRAFIE

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 – 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. pp. 151 – 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Apendicele 4

Exemple de condiții de creștere pentru anumite specii cultivate

Următoarele condiții s-au dovedit a fi adecvate pentru 10 specii cultivate și pot fi utilizate ca orientare pentru teste în camere de cultivare și în cazul altor specii:

concentrația de dioxid de carbon: 350 ± 50 ppm;

umiditatea relativă: 70 ± 5 % pe perioadele de lumină și 90 ± 5 % pe perioadele de întuneric;

temperatura: 25 ± 3 °C în timpul zilei, 20 ± 3 °C în timpul nopții;

fotoperioada: 16 ore de lumină/8 ore de întuneric, presupunând o lungime de undă medie de 400-700 nm;

lumina: luminanță de 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, măsurată deasupra frunzișului.

Speciile cultivate sunt:

— pătlăgeaua roșie (*Solanum lycopersicon*);

— castravetele (*Cucumis sativus*);

— salata verde (*Lactuca sativa*);

— soia (*Glycine max*);

— varza (*Brassica oleracea var. capitata*);

— morcovul (*Daucus carota*);

— ovăzul (*Avena sativa*);

— zizania (*Lolium perenne*);

— porumbul (*Zea mays*);

— ceapa (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. TEST DE REPRODUCERE A ENCHITREIDELOR

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 220 (2004). Aceasta este destinată utilizării în scopul evaluării efectelor substanțelor chimice asupra ratei de reproducere a viermelui enchitreid, *Enchytraeus albidus,* Henle 1873, în sol. Are ca bază principală o metodă elaborată de Umweltbundesamt, Germania (1) care a fost supusă unui ring test (2). Au fost luate în considerare și alte metode de testare a toxicității substanțelor chimice asupra enchitreidelor și râmelor (3)(4)(5)(6)(7)(8).

CONSIDERAȚII INIȚIALE

2. Anelidele din genul *Enchytraeus* care trăiesc în sol sunt specii relevante din punct de vedere ecologic pentru testarea ecotoxicității. Deși enchitreidele se găsesc adesea în soluri care conțin râme, este adevărat și faptul că de multe ori acestea sunt prezente în abundență în multe soluri din care râmele lipsesc. Enchitreidele pot fi utilizate în testele de laborator, precum și în studiile derulate pe teren sau parțial pe teren. Din punct de vedere practic, multe specii de *Enchytraeus* sunt ușor de manipulat și de înmulțit, iar durata generației lor este semnificativ mai scurtă decât în cazul râmelor. Durata unui test de reproducere cu enchitreide este, prin urmare, de doar 4-6 săptămâni, în timp ce în cazul râmelor (*Eisenia fetida*) acesta durează 8 săptămâni.

3. Informații de bază despre ecologia și ecotoxicologia enchitreidelor în mediul terestru pot fi găsite în referințele (9)(10)(11)(12).

PRINCIPIUL TESTULUI

4. Enchitreidele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare amestecate într-un sol artificial. Scenariul de testare poate fi împărțit în două etape: (a) un test de stabilire a intervalului, în cazul în care nu sunt disponibile suficiente informații, în care mortalitatea reprezintă principalul punct final evaluat după două săptămâni de expunere și (b) un test de reproducere final în care se evaluează numărul total de viermi tineri produs de animalul părinte și rata de supraviețuire a animalelor părinți. Durata testului final este de șase săptămâni. După primele trei săptămâni, viermii adulți se scot și se înregistrează schimbările morfologice. După încă trei săptămâni, se calculează numărul de descendenți eclozați din coconii produși de adulți. Rata de reproducere a animalelor expuse la substanța chimică de testare este comparată cu cea din proba (probele) de control în vederea determinării (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau (ii) EC_x (de exemplu EC_{10}, EC_{50}) utilizând un model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza o reducere cu x % a ratei de reproducere. Concentrațiile de testare trebuie să încadreze EC_x (de exemplu EC_{10}, EC_{50}) astfel încât EC_x să fie mai degrabă interpolată decât extrapolată.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

5. Ar fi de preferat să se cunoască solubilitatea în apă, log K_{ow}, coeficientul de partiție sol/apă (de exemplu capitolele C.18 și C.19 din prezenta anexă) și presiunea de vapori a substanței chimice de testare. Sunt de dorit informații suplimentare privind evoluția substanței chimice de testare în sol, precum viteza de fotoliză și de hidroliză.

6. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței chimice de testare va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție aer/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

▼M6

VALIDITATEA TESTULUI

7. Pentru ca testul să fie valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii de performanță:

— mortalitatea adulților nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului de stabilire a intervalului și în primele trei săptămâni ale testului de reproducere;

— presupunând că s-au folosit 10 adulți pentru fiecare vas pentru pregătirea testului, la finalul testului trebuie să fi fost produsă o medie de cel puțin 25 de viermi tineri în fiecare vas;

— coeficientul de variație calculat pentru numărul mediu de viermi tineri nu trebuie să fie mai mare de 50 % la finalul testului de reproducere.

În cazul în care un test nu îndeplinește criteriile de validitate de mai sus, testul trebuie încheiat, cu excepția cazului în care poate fi oferită o justificare pentru continuarea testului. Justificarea trebuie inclusă în raportul de testare.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

8. Pentru a verifica dacă răspunsul organismelor de testare nu s-a modificat în timp, o substanță chimică de referință trebuie să fie testată la intervale regulate sau, eventual, să fie inclusă în fiecare test. O substanță chimică de referință adecvată este carbendazimul, care s-a demonstrat că afectează supraviețuirea și reproducerea enchitreidelor (13)(14), sau pot fi utilizate alte substanțe chimice ale căror date despre toxicitate sunt bine cunoscute. În cadrul unui ring test (2), s-a utilizat o formulă de carbendazim cunoscută sub denumirea comercială Derosal ™ furnizată de societatea AgrEvo (Frankfurt, Germania) și conținând 360 g/l (32,18 %) ingredient activ. EC_{50} pentru reproducere determinată în cadrul ring testului s-a încadrat în limita a 1,2 ± 0,8 mg ingredient activ (i.a.)/kg masă uscată (2). În cazul în care este inclus în seria de testare un standard toxic pozitiv, se utilizează o concentrație, iar numărul de probe duplicat trebuie să fie același cu cel de probe de control. Pentru carbendazim, se recomandă testarea a 1,2 mg i.a./kg greutate uscată (testat ca formulă lichidă).

DESCRIEREA TESTULUI

Echipamente

9. Vasele de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material inert din punct de vedere chimic. Borcanele de sticlă (de exemplu, volum: 0,20-0,25 litri; diametru: ≈ 6 cm) sunt adecvate. Vasele trebuie să aibă capace transparente (de exemplu din sticlă sau din polietilenă) care să fie concepute pentru a reduce evaporarea apei, permițând în același timp schimbul de gaze între sol și atmosferă. Capacele trebuie să fie transparente pentru a permite trecerea luminii.

10. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă în special următoarele:

— dulap pentru uscare;

— stereomicroscop;

— pH-metru și fotometru;

— cântare de precizie adecvate;

— echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;

— echipamente adecvate pentru controlul umidității (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt prevăzute cu capace);

— incubator sau o cameră mică prevăzută cu sistem de climatizare;

— pensete, cârlige sau anse;

— bazin fotografic.

Pregătirea solului artificial

11. În cadrul prezentului test se utilizează un sol artificial (5)(7) având următoarea compoziție (pe baza greutăților uscate, uscat la o temperatură de 105 °C până la obținerea unei greutăți constante):

▼**M6**

— 10 % turbă cu mușchi, uscată cu aer și măcinată fin (este acceptabilă o dimensiune de 2 ± 1 mm a particulelor); se recomandă să se verifice dacă un sol preparat cu un lot proaspăt de turbă este adecvat pentru cultura viermilor înainte de a fi utilizat pentru un test;

— 20 % argilă caolinică (de preferință, conținut caolinit de peste 30 %);

— aproximativ 0,3-1,0 % carbonat de calciu ($CaCO_3$, pulverizat, puritate analitică) pentru a obține un pH de 6,0 ± 0,5; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei;

— aproximativ 70 % nisip cuarțos uscat cu aer (în funcție de cantitatea de $CaCO_3$ necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % dintre particule măsurând între 50 și 200 de microni.

Se recomandă demonstrarea caracterului adecvat al unui sol artificial pentru cultura viermilor și pentru îndeplinirea criteriilor de validitate înainte de a-l utiliza în cadrul unui test final. Efectuarea unei astfel de verificări se recomandă în special pentru a asigura faptul că performanța testului nu este compromisă în cazul în care conținutul de carbon organic al solului artificial este redus, de exemplu, prin reducerea conținutului de turbă la 4-5 % și creșterea conținutului de nisip în consecință. Printr-o astfel de reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de adsorbție a substanței chimice de testare în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice de testare pentru viermi. S-a demonstrat că *Enchytraeus albidus* poate satisface criteriile de validitate privind reproducerea când este testat pe soluri naturale cu conținut mai scăzut de carbon organic decât cel menționat mai sus (de exemplu 2,7 %) (15) și s-a constatat experimental, deși într-un număr limitat de studii, că acest rezultat poate fi obținut și cu un sol artificial cu 5 % turbă.

Notă: Când se utilizează sol natural în cadrul unui test suplimentar (de exemplu, la un nivel superior), trebuie să se demonstreze, de asemenea, caracterul adecvat al solului și îndeplinirea criteriilor de validitate ale testului.

12. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un mixer de laborator mare). Această operațiune trebuie realizată cu cel puțin o săptămână înainte de începerea testului. Solul amestecat trebuie depozitat timp de două zile pentru a i se echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și 1 M de soluție de clorură de potasiu (KCl) sau 0,01 M de clorură de calciu ($CaCl_2$) într-un raport de 1:5 [a se vedea referința (16) și apendicele 3]. Dacă aciditatea solului este mai mare decât limita impusă (a se vedea punctul 11), aceasta poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de $CaCO_3$. Dacă solul este prea alcalin, acest lucru poate fi ajustat prin adăugarea unei cantități suplimentare din amestecul menționat la punctul 11, dar fără $CaCO_3$.

13. Capacitatea maximă de retenție a apei (WHC) a solului artificial se determină conform procedurilor descrise în apendicele 2. Cu una-două zile înainte de începerea testului, solul artificial uscat este preumezit prin adăugarea unei cantități suficiente de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, adică 40-60 % din capacitatea maximă de retenție a apei. La începutul testului, solul preumezit este împărțit în porții corespunzătoare numărului de concentrații de testare (și substanța chimică de referință, dacă este cazul) și de probe de control folosite pentru test. Conținutul de umiditate se ajustează la 40-60 % din

▼M6

WHC maximă prin adăugarea soluției de substanță chimică de testare și/sau prin adăugarea de apă distilată sau deionizată (a se vedea punctele 19-21). Conținutul de umiditate se determină la începutul și la sfârșitul testului (prin uscarea la 105 °C până la obținerea unei greutăți constante) și ar trebui să se încadreze în intervalul optim pentru supraviețuirea viermilor. Se poate efectua o verificare aproximativă a conținutului de umiditate din sol strângând ușor solul în mână; în cazul în care conținutul de umiditate este cel corect, trebuie să apară între degete picături mici de apă.

Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare

14. Specia de testare recomandată este *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (viermele alb), membru al familiei *Enchytraeidae* (ordinul *Oligochaeta*, încrengătura *Annelida*). *E. albidus* este una dintre cele mai mari specii de enchitreide, fiind înregistrate specimene de până la 35 mm lungime (17)(18). *E. albidus* are o răspândire mondială și poate fi întâlnit în habitate marine, de apă dulce și terestre, în special în materia organică aflată în descompunere (alge, compost) și rareori în pajiști (9). Toleranța sa ecologică largă și unele variații morfologice ar putea indica existența diferitor rase.

15. *E. albidus* este disponibil în comerț ca hrană pentru pești. Ar trebui verificat dacă cultura este contaminată cu alte specii, în general mai mici (1) (19). În cazul în care apare contaminarea, toți viermii ar trebui spălați cu apă într-o cutie Petri. Apoi ar trebui selectate specimene adulte mari de *E. albidus* (utilizând un stereomicroscop) pentru a începe o nouă cultură, iar toți ceilalți viermi se elimină. *E. albidus* poate fi crescut cu ușurință pe o gamă largă de materii organice (a se vedea apendicele 4). Ciclul de viață al *E. albidus* este scurt deoarece maturitatea survine între 33 de zile (la 18 °C) și 74 de zile (la 12 °C) (1). Pentru test se vor utiliza numai culturile care au fost păstrate fără probleme în laborator timp de cel puțin 5 săptămâni (o generație).

16. Pot fi utilizate și alte specii din genul *Enchytraeus*, de exemplu *E. buchholzi* Vejdovsky 1879, sau *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (a se vedea apendicele 5). Dacă se folosesc alte specii de *Enchytraeus*, acestea trebuie să fie clar identificate și ar trebui raportată o justificare pentru selectarea speciei.

17. Animalele care se utilizează în cadrul testelor sunt viermii adulți. Aceștia trebuie să aibă ouă (puncte albe) în zona clitelumului și ar trebui să aibă aproximativ aceeași dimensiune (în jur de 1 cm lungime). Sincronizarea culturii de înmulțire nu este necesară.

18. Dacă enchitreidele nu sunt crescute în același tip de sol și în aceleași condiții (inclusiv de hrănire) utilizate pentru test, acestea trebuie aclimatizate timp de cel puțin 24 de ore și până la trei zile. Pentru a permite respingerea specimenelor rănite sau inadecvate pentru orice alt motiv, trebuie aclimatizat la început un număr mai mare de adulți decât cel necesar pentru desfășurarea testului. La finalul perioadei de aclimatizare, se vor selecta pentru test numai viermii care au ouă și care nu prezintă anomalii de comportament (de exemplu să încerce să iasă din sol). Viermii se scot cu atenție utilizând o pensetă de bijutier, cârlige sau anse și se pun într-o cutie Petri conținând o cantitate mică de apă proaspătă. Pentru acest scop se preferă apa proaspătă reconstituită, conform propunerii din capitolul C.20 al prezentei anexe (Test de reproducere pentru *Daphnia magna*), deoarece apa deionizată, demineralizată sau de la robinet ar putea fi dăunătoare viermilor. Viermii se inspectează cu ajutorul unui stereomicroscop și toți cei care nu au ouă se elimină. Trebuie avut grijă să se scoată și să se elimine acarienii sau colembolele care ar fi putut infecta culturile. Viermii sănătoși neutilizați pentru test se pun înapoi în cultura stoc.

▼M6

Pregătirea concentrațiilor de testare

Substanță chimică de testare solubilă în apă

19. În apă deionizată, se pregătește o soluție a substanței chimice de testare, într-o cantitate suficientă pentru toate probele duplicat necesare pentru o concentrație de testare. Se recomandă utilizarea unei cantități corespunzătoare de apă pentru a obține conținutul de umiditate necesar, și anume 40-60 % din WHC maximă (a se vedea punctul 13). Fiecare soluție de substanță chimică de testare se amestecă bine cu un lot de sol preumezit în prealabil înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

Substanță chimică de testare insolubilă în apă

20. În cazul substanțelor chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică de testare poate fi dizolvată în cel mai mic volum posibil al unui dizolvant adecvat (de exemplu, acetonă). Trebuie utilizați numai solvenți volatili. Dizolvantul se pulverizează sau se amestecă cu o cantitate redusă, de exemplu 2,5 g, de nisip cuarțos. Dizolvantul se elimină prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin o oră. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după adăugarea unei cantități corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține umiditatea dorită. Amestecul final se introduce în vasele de testare.

21. În cazul substanțelor chimice puțin solubile în apă și solvenți organici, echivalentul de 2,5 g de nisip cuarțos fin măcinat pentru fiecare vas de testare este amestecat cu cantitatea de substanță chimică pentru a obține concentrația de testare dorită. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final se distribuie în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, o probă de control corespunzătoare.

22. În general, substanțele chimice nu ar trebui testate la concentrații mai mari de 1 000 mg/kg masă uscată de sol. Testarea la concentrații mai mari poate fi totuși necesară pentru obiectivele unui anumit test.

DESFĂȘURAREA TESTELOR

Grupuri de testare și de control

23. Pentru fiecare concentrație de testare, o cantitate de sol de testare corespunzătoare unei cantități de 20 g de greutate uscată se pune în vasul de testare (a se vedea punctele 19-21). Se pregătesc, de asemenea, probe de control, fără substanța chimică de testat. În fiecare vas se adaugă hrană în conformitate cu procedurile descrise la punctul 29. În fiecare vas de testare se distribuie aleatoriu 10 viermi. Viermii se transferă cu atenție în fiecare vas de testare și se așează pe suprafața solului utilizând, de exemplu, o pensetă de bijutier, cârlige sau anse. Numărul de probe duplicat pentru concentrațiile de testare și pentru probele de control depinde de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctul 34). Vasele de testare sunt poziționate în mod aleatoriu în incubatorul de testare, respectivele poziții fiind modificate săptămânal.

24. În cazul utilizării unui dizolvant pentru aplicarea substanței chimice de testare, pe lângă seriile de testare, trebuie testată o serie de control conținând nisip cuarțos pulverizat sau amestecat cu solvent. Concentrația solventului sau a agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele de testare ce conțin substanța chimică de testare. Pentru substanțele chimice care necesită o administrare conformă cu procedurile descrise la punctul 21, trebuie testată o serie de control care să conțină nisip cuarțos suplimentar (2,5 g per vas).

▼M6

Condițiile de testare

25. Temperatura medie de testare este de 20 ± 2 °C. Pentru a împiedica viermii să iasă din sol, testul se efectuează în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în zona vaselor de testare.

26. Pentru a verifica umiditatea solului, vasele se cântăresc la începutul testului, iar apoi o dată pe săptămână. Pierderea în greutate se compensează prin adăugarea unei cantități adecvate de apă deionizată. Trebuie remarcat faptul că pierderea de apă poate fi redusă prin menținerea unei umidități ridicate a aerului (> 80 %) în incubatorul de testare.

27. Conținutul de umiditate și pH-ul trebuie măsurate la începutul și la sfârșitul testului atât în cazul testului de stabilire a intervalului, cât și în cazul testului final. Trebuie efectuate măsurători în eșantioanele de sol de control și tratate (la toate concentrațiile), preparate și menținute în aceleași condiții ca și culturile de testare, dar fără să conțină viermi. La aceste eșantioane se adaugă hrană numai la începutul testului pentru a facilita activitatea microbiană. Cantitatea de hrană adăugată trebuie să fie identică cu cea adăugată în culturile de testare. Nu este necesar să se mai adauge hrană în aceste vase pe parcursul testului.

Hrănirea

28. Poate fi utilizată o hrană care poate întreține populația de enchitreide. S-a constatat că fulgii de ovăz, de preferat autoclavați înainte de utilizare pentru a evita contaminarea microbiană (încălzirea este, de asemenea, adecvată), reprezintă o hrană corespunzătoare.

29. La început, hrana se administrează amestecând 50 mg de fulgi de ovăz măcinați cu solul din fiecare vas înainte de a introduce viermii. Apoi, hrana se administrează zilnic până în ziua 21. În ziua 28 nu se mai administrează hrană, deoarece în această etapă adulții vor fi fost scoși iar viermii tineri au nevoie de hrană suplimentară relativ puțină după acest moment. Hrana din timpul testului constă în 25 mg de fulgi de ovăz măcinați pentru fiecare vas, așezați cu atenție pe suprafața solului pentru a evita rănirea viermilor. Pentru a evita creșterea ciupercilor, fulgii de ovăz trebuie îngropați în sol prin acoperirea lor cu mici cantități de sol. Dacă hrana rămâne neconsumată, rația trebuie redusă.

Proiectul testului de stabilire a intervalului

30. Atunci când este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații ale substanțelor chimice de testare de 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg (greutate uscată a solului). O probă duplicat pentru fiecare tratament și fiecare probă de control este suficientă.

31. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni. La sfârșitul testului, se evaluează mortalitatea viermilor. Un vierme este înregistrat ca fiind mort dacă nu are nicio reacție la un stimul mecanic la capătul anterior. Pentru a decide intervalul de concentrații pentru testul final, pot fi utile și alte informații pe lângă mortalitate. Modificările comportamentului adulților (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol, poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei lor (de exemplu, prezența unor răni deschise) ar trebui, prin urmare, să fie consemnate împreună cu eventuala prezență a viermilor tineri. Aceasta din urmă poate fi determinată prin utilizarea metodei colorării descrise în apendicele 6.

32. LC_{50} se poate determina cu aproximație prin calcularea mediei geometrice a datelor legate de mortalitate. La stabilirea intervalului de concentrații pentru testul final, efectele asupra reproducerii se presupun a fi mai mici decât LC_{50} cu un factor de maximum 10. Cu toate acestea, este vorba despre o

▼M6

relație empirică și, în orice caz specific, aceasta ar putea fi diferită. Observațiile suplimentare din timpul testului de stabilire a intervalului precum prezența viermilor tineri poate ajuta la rafinarea intervalului de concentrații ale substanței chimice de testare care vor fi utilizate pentru testul final.

33. Pentru o determinare precisă a LC_{50}, se recomandă efectuarea testului utilizând cel puțin patru probe duplicat pentru fiecare dintre concentrațiile substanței chimice de testare și un număr adecvat de concentrații pentru a cauza cel puțin patru răspunsuri medii semnificativ diferite din punct de vedere statistic la aceste concentrații. Dacă este cazul, se utilizează un număr similar de concentrații și de probe duplicat pentru probele de control.

Proiectul testului de reproducere final

34. Sunt propuse trei proiecte de test, pe baza recomandărilor formulate în cadrul unui ring test (2).

— Pentru stabilirea NOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie distanțate cu un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

— Pentru determinarea EC_x (de exemplu EC_{10}, EC_{50}), trebuie testate cel puțin cinci concentrații, iar concentrațiile trebuie să încadreze EC_x pentru a permite interpolarea și nu extrapolarea EC_x. Se recomandă cel puțin patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și patru probe duplicat de control. Factorul de diluție poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în seria de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrațiile cele mai mari și cele mai scăzute.

— O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și EC_x. Trebuie utilizate opt concentrații de tratament în serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare tratament și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie distanțate cu un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

35. Trebuie utilizați câte 10 viermi adulți pentru fiecare vas de testare (a se vedea punctul 23). Hrana se adaugă în vasele de testate la începutul testului, iar apoi o dată pe săptămână (a se vedea punctul 29) până inclusiv în ziua 21. În ziua 21, probele de sol se verifică ușor cu mâna pentru a observa și a număra viermii adulți vii, iar modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol, poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) se consemnează. Ulterior, toți viermii adulți se scot din vasele de testare și din solul de testare. Solul de testare conținând eventual coconii produși se incubează timp de trei săptămâni suplimentare în aceleași condiții de testare, cu excepția faptului că hrănirea are loc abia în ziua 35 (adică, 25 mg de fulgi de ovăz măcinați pentru fiecare vas).

36. După șase săptămâni, se numără viermii nou eclozați. Se recomandă metoda bazată pe colorarea cu roșu Bengal (a se vedea apendicele 6), deși s-au dovedit a fi adecvate și alte tehnici de extracție umedă (dar fără căldură) și de flotație (a se vedea apendicele 6) (4)(10)(11)(20). Se recomandă colorarea cu roșu Bengal deoarece extracția umedă dintr-un substrat de sol poate fi împiedicată de turbiditatea cauzată de particulele de argilă în suspensie.

Test la valori-limită

37. În cazul în care nu se observă niciun efect la cea mai mare concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere poate fi realizat sub forma unui test la valori-limită, utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg pentru a demonstra că NOEC pentru reproducere este mai mare decât această valoare.

▼M6

Rezumatul și calendarul testului

38. Etapele testului pot fi rezumate după cum urmează:

Momentul	Testul de stabilire a intervalului	Testul final
Ziua –7 sau mai devreme	— Pregătirea solului artificial (amestecarea constituenților uscați)	— Pregătirea solului artificial (amestecarea constituenților uscați)
Ziua –5	— Verificarea pH-ului solului artificial — Măsurarea WHC max. a solului	— Verificarea pH-ului solului artificial — Măsurarea WHC max. a solului
Ziua –5 până la –3	— Sortarea viermilor pentru aclimatizare	— Sortarea viermilor pentru aclimatizare
Ziua – 3 până la 0	— Aclimatizarea viermilor timp de cel puțin 24 de ore	— Aclimatizarea viermilor timp de cel puțin 24 de ore
Ziua –1	— Preumezirea solului artificial și distribuirea în loturi	— Preumezirea solului artificial și distribuirea în loturi
Ziua 0	— Prepararea soluțiilor stoc — Aplicarea substanței chimice de testare — Cântărirea substratului de testare în vasele de testare — Amestecarea hranei în sol — Introducerea viermilor — Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol	— Prepararea soluțiilor stoc — Aplicarea substanței chimice de testare — Cântărirea substratului de testare în vasele de testare — Amestecarea hranei în sol — Introducerea viermilor — Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol
Ziua 7	— Verificarea conținutului de umiditate din sol	— Verificarea conținutului de umiditate din sol — Hrană
Ziua 14	— Determinarea mortalității adulților — Estimarea numărului de viermi tineri — Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol	— Verificarea conținutului de umiditate din sol — Hrană
Ziua 21		— Observarea comportamentului adulților — Scoaterea adulților — Determinarea mortalității adulților — Verificarea conținutului de umiditate din sol — Hrană
Ziua 28		— Verificarea conținutului de umiditate din sol — Fără hrană
Ziua 35		— Verificarea conținutului de umiditate din sol — Hrană
Ziua 42		— Numărarea viermilor tineri — Măsurarea pH-ului și a conținutului de umiditate din sol

▼M6

DATE ŞI RAPORT

Prelucrarea rezultatelor

39. Cu toate că în apendicele 7 este furnizată o prezentare generală, în cadrul prezentei metode de testare nu este oferită nicio orientare statistică definitivă pentru analiza rezultatelor testului.

40. În cadrul testului de stabilire a intervalului, punctul final principal este mortalitatea. Cu toate acestea, modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) viermilor adulți trebuie, de asemenea, înregistrate împreună cu prezența eventualilor viermi tineri. De obicei, trebuie aplicată analiza probit (21) sau regresia logistică pentru determinarea LC_{50}. Cu toate acestea, în cazurile în care această metodă de analiză nu este adecvată (de exemplu, dacă sunt disponibile mai puțin de trei concentrații având ca efect mortalitatea parțială), pot fi utilizate metode alternative. Aceste metode ar putea include mediile mobile (22), metoda simplificată Spearman-Karber (23) sau simpla interpolare (de exemplu, media geometrică a LC_0 și LC_{100}, calculată prin înmulțirea rădăcinii pătrate a LC_0 cu LC_{100}).

41. În cadrul testului final, punctul final principal este fecunditatea (adică numărul de viermi tineri produși). Cu toate acestea, ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne de nocivitate trebuie înregistrate în raportul final. Pentru a calcula rezultatele reproducerii, analiza statistică necesită cunoașterea mediei aritmetice și a abaterii standard per tratament și per probă de control.

42. Dacă s-a efectuat o analiză a variației, abaterea standard, s, și gradele de libertate, df, pot fi înlocuite de estimarea variației combinate obținute din ANOVA și, respectiv, de gradele sale de libertate, cu condiția ca varianța să nu depindă de concentrație. În acest caz, se utilizează variațele unice ale probelor de control și ale probelor supuse tratamentului. Respectivele valori se calculează de obicei cu ajutorul unui software statistic comercial utilizând ca duplicat rezultatele pentru fiecare vas. În cazul în care combinarea datelor pentru probele de control negative și pentru probele de control cu solvent pare rezonabilă în locul testării în raport cu una dintre ele, acestea trebuie testate pentru a vedea dacă nu diferă în mod semnificativ (pentru teste adecvate, a se vedea punctul 45 și apendicele 7).

43. Testarea statistică și inferența suplimentare depind de distribuția normală și omogenitatea valorilor duplicate în ceea ce privește varianța.

Estimarea NOEC

44. Ar fi de preferat aplicarea unor teste puternice. Trebuie utilizate informații, de exemplu, din experiența anterioară din cadrul ring testelor sau alte date istorice, cu privire la distribuția aproximativ normală a datelor. Omogenitatea variației (omoscedasticitatea) este mai importantă. Experiența arată că varianța crește adesea odată cu creșterea mediei. În aceste cazuri, o transformare a datelor ar putea duce la omoscedasticitate. Cu toate acestea, o astfel de transformare ar trebui să se bazeze mai degrabă pe experiența cu datele istorice decât pe datele studiate. Cu date omogene, ar trebui efectuate teste t multiple cum ar fi testul lui Williams ($\alpha = 0{,}05$, unilateral) (24)(25) sau, în anumite cazuri, testul lui Dunnett (26)(27). Trebuie remarcat faptul că, în cazul unei duplicări inegale, valorile t din tabel trebuie corectate astfel cum au sugerat Dunnett și Williams. Uneori, din cauza variației mari, răspunsurile nu cresc/descresc în mod regulat. În acest caz de abatere puternică de la monotonicitate, testul lui Dunnett este mai adecvat. Dacă există abateri de la omoscedasticitate, ar putea fi rezonabilă examinarea mai îndeaproape a posibilelor efecte asupra variațelor pentru a decide dacă testele t pot fi aplicate fără a pierde mult din putere (28). În mod alternativ, se poate aplica un test U multiplu, de exemplu testul

▼M6

U al lui Bonferroni după Holm (29), sau, când aceste date prezintă heteroscedasticitate, dar din alte puncte de vedere corespund unei relații doză-răspuns subiacente monotone, un alt test neparametric [de exemplu, Jonckheere-Terpstra (30) (31) sau Shirley (32) (33)] și ar fi în general de preferat testelor t cu varianță inegală. (A se vedea, de asemenea, schema din apendicele 7.)

45. Dacă s-a efectuat un test la valori-limită, iar premisele procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate) sunt îndeplinite, poate fi utilizat testul t (Student) pe perechi sau procedura de testare U al lui Mann-Whitney (29).

Estimarea EC_x

46. Pentru a calcula orice valoare a EC_x, se utilizează mediile pentru fiecare tratament pentru analiza regresiei (liniară sau neliniară), după obținerea unei funcții doză-răspuns adecvate. Pentru creșterea viermilor considerată răspuns continuu, valorile EC_{x-} pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată (35). Printre funcțiile potrivite pentru datele binare (mortalitate/supraviețuire și număr de descendenți produși) se numără funcția sigmoidă normală, funcția logistică sau funcția Weibull, cu doi sau patru parametri, dintre care unii pot modela și răspunsuri hormetice. Dacă s-a stabilit o funcție doză-răspuns prin analiză de regresie liniară, trebuie obținut un r^2 (coeficient de determinare) și/sau o pantă semnificative în analiza de regresie înainte de a estima EC_x prin introducerea unei valori corespunzătoare x % din media probelor de control în ecuația obținută prin analiza de regresie. Limitele de încredere de 95 % se calculează după metoda lui Fieller [citată de Finney (21)] sau după alte metode moderne adecvate.

47. Alternativ, răspunsul se modelează ca procentaj sau proporție din parametrul modelului, care se interpretează ca răspuns mediu al probelor de control. În aceste cazuri, curba sigmoidă normală (logistică, Weibull) poate fi adesea ajustată la rezultate utilizând procedura de regresie probit (21). În aceste cazuri, funcția de ponderare trebuie ajustată pentru răspunsurile metrice potrivit lui Christensen (36). Cu toate acestea, dacă se observă o hormeză, analiza probit ar trebui înlocuită cu o funcție logistică sau Weibull cu patru parametri, stabilită printr-o procedură de regresie neliniară (36). Dacă este imposibilă ajustarea unei funcții doză-răspuns adecvate la date, se pot utiliza metode alternative de estimare a EC_x și a limitelor sale de încredere, cum ar fi mediile mobile după Thompson (22) și procedura Spearman-Karber simplificată (23).

RAPORTUL DE TESTARE

48. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică de testare:

— natura fizică și, după caz, proprietățile fizico-chimice (de exemplu solubilitatea în apă, presiunea de vapori);

— identificarea chimică a substanței chimice de testare în conformitate cu nomenclatorul IUPAC, numărul CAS, lotul de fabricație, lotul de ambalare, formula structurală și puritatea;

— data de expirare a eșantionului.

Specia de testare:

— animalele de testare utilizate: specia, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de înmulțire.

Condițiile de testare:

— ingredientele și pregătirea solului artificial;

▼M6

— metoda de aplicare a substanței chimice de testare;

— descrierea condițiilor de testare, inclusiv temperatura, conținutul de umiditate, pH-ul etc.;

— descrierea completă a protocolului și a procedurilor de testare.

Rezultatele testului:

— mortalitatea viermilor adulți după două săptămâni și numărul de viermi tineri la finalul testului de stabilire a intervalului;

— mortalitatea viermilor adulți după trei săptămâni de expunere și numărul total de viermi tineri la finalul testului final;

— orice simptom fizic sau patologic și orice modificare a comportamentului observate la organismele de testare;

— valorile LC_{50}, NOEC și/sau EC_x (de exemplu, EC_{50}, EC_{10}) pentru reproducere, în cazul în care unele dintre acestea sunt aplicabile cu intervale de încredere și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea acestora, toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor.

Abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

BIBLIOGRAFIE

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. și Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. și Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. și Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Capitolul C.8 al prezentei anexe, Toxicitatea la râme.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. și A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. și Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. şi Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. şi Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. şi Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. şi Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo şi R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. și F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. și J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„EC_x” (concentrația efectivă pentru un efect de x %) înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. În cadrul prezentului test, concentrațiile efective sunt exprimate ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LC_0” (concentrație neletală) înseamnă concentrația unei substanțe chimice de testare care nu ucide niciunul dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC_0 este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LC_{50}” (concentrație letală medie) înseamnă concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 50 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC_{50} este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LC_{100}” (concentrație în întregime letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 100 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC_{100} este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LOEC” (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) înseamnă cea mai scăzută concentrație a substanței chimice de testat care are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). În cadrul prezentului test, LOEC este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare. Toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să indice în mod normal un efect diferit din punct de vedere statistic de cel observat în cazul probei de control. Orice abatere de la cele sus-menționate pentru identificarea LOEC trebuie justificată în raportul de testare.

„NOEC” (concentrația la care nu se observă niciun efect) înseamnă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare aflată imediat sub LOEC la care nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„Rată de reproducere” înseamnă numărul mediu de viermi tineri produși raportat la numărul de adulți pe parcursul perioadei de testare.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

▼M6

Apendicele 2

Determinarea capacității maxime de retenție a apei

Determinarea capacității de retenție a apei a solului artificial

Următoarea metodă s-a dovedit a fi adecvată. Ea este descrisă în anexa C la ISO DIS 11268-2.

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru și, după umplerea sa cu apă, se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas închis (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită, uscată la o temperatură de 105 °C până ce atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC (în \% din masa uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat cu apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

BIBLIOGRAFIE:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Apendicele 3

Determinarea pH-ului solului

Următoarea metodă de determinare a pH-ului probei de sol se bazează pe descrierea din ISO 10390 (Calitatea solului – Determinarea pH-ului).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său formată din 1 M de clorură de potasiu (KCl) de puritate analitică sau 0,01 M de clorură de calciu ($CaCl_2$) de puritate analitică. Ulterior, suspensia se agită bine timp de cinci minute. După agitare, suspensia se lasă la limpezit timp de cel puțin 2 ore, dar nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).

BIBLIOGRAFIE:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Apendicele 4

Condiții de cultură a speciilor de *Enchytraeus*

Enchitreidele din specia *Enchytraeus albidus* (precum și alte specii de *Enchytraeus*) pot fi crescute în cutii mari de plastic (de exemplu 30 × 60 × 10 cm) umplute cu un amestec 1:1 de sol artificial și sol de grădină natural necontaminat. Trebuie evitată utilizarea compostului deoarece acesta poate conține substanțe chimice toxice, cum ar fi metale grele. Fauna trebuie eliminată din sol înainte de utilizare (de exemplu, prin congelare). Se poate utiliza și un substrat format doar din sol artificial, însă rata de reproducere poate fi mai mică decât cea obținută cu un substrat de sol amestecat. Substratul utilizat pentru cultură trebuie să aibă un pH de 6,0 ± 0,5.

Cultura se păstrează la întuneric, la o temperatură de 15-20 °C ± 2 °C. Trebuie evitate temperaturile mai mari de 23 °C. Solul trebuie menținut umed, dar nu ud. Conținutul de umiditate corect este indicat de apariția unor mici picături de apă între degete atunci când solul este strâns ușor în mână. Crearea de condiții anoxice trebuie evitată prin asigurarea faptului că recipientele de cultură permit un schimb de gaze adecvat cu atmosfera. Solul trebuie întors cu grijă săptămânal pentru a facilita aerarea.

Viermii pot fi hrăniți cu fulgi de ovăz. Fulgii de ovăz trebuie păstrați în vase închise ermetic și autoclavați sau încălziți înainte de utilizare pentru a evita infecțiile cu acarieni de făină (de exemplu, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) sau cu acarieni prădători [de exemplu, *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. După tratamentul termic, hrana trebuie măcinată pentru a putea fi ușor împrăștiată pe suprafața solului. Din când în când, fulgii de ovăz pot fi suplimentați cu vitamine, lapte și ulei de ficat de cod. Alte surse adecvate de hrană sunt drojdia de panificație și hrana pentru pești „Tetramin”.

Administrarea hranei se face aproximativ de două ori pe săptămână. O cantitate adecvată de fulgi de ovăz se împrăștie pe suprafața solului sau se amestecă cu grijă în substrat atunci când se întoarce solul pentru a facilita aerarea. Cantitatea absolută de hrană furnizată depinde de numărul de viermi prezenți în substrat. Cu titlu orientativ, cantitatea de hrană trebuie crescută dacă este consumată în decurs de o zi de la administrare. Invers, dacă pe suprafața solului încă mai există hrană la momentul celei de a doua administrări de hrană (o săptămână mai târziu), cantitatea trebuie redusă. Hrana contaminată cu ciuperci trebuie eliminată și înlocuită. După trei luni, viermii trebuie transferați într-un substrat proaspăt.

Condițiile de cultură sunt considerate satisfăcătoare dacă viermii: (a) nu încearcă să părăsească substratul, (b) se mișcă repede prin sol, (c) prezintă o suprafață exterioară lucioasă, fără particule de sol lipite, (d) au o culoare mai mult sau mai puțin albicioasă (e) prezintă o varietate de intervale de vârstă în culturi și (f) se reproduc continuu.

▼M6

Apendicele 5

Desfășurarea testului cu alte specii de *Enchytraeus*

Alegerea speciei

Pot fi utilizate și alte specii decât *E. albidus*, însă procedura de testare și criteriile de validitate trebuie adaptate în consecință. Întrucât multe specii de *Enchytraeus* sunt ușor disponibile și pot fi întreținute în mod satisfăcător în laborator, cel mai important criteriu pentru selectarea unei alte specii decât *E. albidus* este relevanța ecologică și, în plus, sensibilitatea comparabilă. Schimbarea speciei poate avea și motive oficiale. De exemplu, în țările în care nu există și nu se poate importa *E. albidus* (de exemplu, din cauza unor restricții de carantină), va fi necesară utilizarea unei alte specii de *Enchytraeus*.

Exemple de specii alternative adecvate

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): în ultimii ani, această specie a fost deseori folosită în studii ecotoxicologice datorită ușurinței înmulțirii și testării. Cu toate acestea, este vorba despre un vierme mic, ceea ce face manipularea mai dificilă în comparație cu *E. albidus* (în special în etapele anterioare utilizării metodei de colorare). Nu s-a dovedit cu certitudine existența *E. crypticus* în natură, specia fiind descrisă numai în culturi de râme. Prin urmare, nu se cunosc cerințele sale ecologice.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Această denumire acoperă probabil un grup de specii foarte apropiate care sunt dificil de distins din punct de vedere morfologic. Utilizarea sa pentru testare nu se recomandă decât după ce se poate identifica specia indivizilor utilizați într-un test. *E. buchholzi* trăiește de obicei în pajiști sau în locuri perturbate cum ar fi marginea drumurilor.

— *Enchytraeus luxuriosus*: această specie a fost cunoscută inițial ca *E.* „*minutus*”, însă a fost descrisă recent (1). A fost descoperită pentru prima dată de U. Graefe (Hamburg) pe o pajiște din apropiere de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Germania). *E. luxuriosus* are aproximativ jumătate din dimensiunea E. albidus, însă este mai mare decât alte specii discutate în prezentul apendice; această caracteristică o poate transforma într-o bună specie pentru înlocuirea *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): această specie a fost raportată până acum pentru solurile minerale din Germania și Spania, unde este o specie obișnuită, însă de obicei nu foarte abundentă. Spre deosebire de alte specii mici din acest gen, este relativ ușor de identificat. Nu există informații despre comportamentul său în testele de laborator sau despre sensibilitatea sa la substanțele chimice. Cu toate acestea, s-a constatat că este o specie ușor de crescut (E. Belotti, comunicare personală).

Condiții de înmulțire

Toate speciile de *Enchytraeus* menționate mai sus pot fi crescute în aceleași substraturi utilizate pentru *E. albidus*. Având în vedere dimensiunea lor mai mică, vasele de cultură pot fi mai mici și, deși se poate utiliza aceeași hrană, rația trebuie să fie ajustată. Ciclul de viață al acestor specii este mai scurt decât în cazul *E. albidus*, iar administrarea hranei trebuie efectuată mai frecvent.

Condiții de testare

Condițiile de testare sunt în general ca cele aplicabile pentru *E. albidus*, cu următoarele excepții:

— dimensiunea vasului de testare poate (dar nu trebuie) să fie mai mică;

— durata testului de reproducere poate (dar nu trebuie) să fie mai mică, adică patru în loc de șase săptămâni; cu toate acestea, durata testului de stabilire a intervalului nu trebuie modificată;

— având în vedere dimensiunea mică a viermilor tineri, utilizarea metodei de colorare este foarte recomandată pentru numărare;

— criteriul de validitate legat de „numărul de viermi tineri din fiecare vas de testare din proba de control” trebuie schimbat cu „50”.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIE

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Apendicele 6

Descriere detaliată a tehnicilor de extracție

Colorarea cu roșu Bengal

Această metodă, dezvoltată inițial în ecologia limnică (1) a fost propusă pentru prima dată în scopul numărării enchitreidelor tinere din testul de reproducere a enchitreidelor de W. de Coen (Universitatea din Ghent, Belgia). O versiune modificată (roșu Bengal amestecat cu formaldehidă în loc de etanol) a fost dezvoltată independent de RIVM Bilthoven (2)(3).

La sfârșitul testului final (adică după șase săptămâni), solul din vasele de testare se transferă într-un recipient cu adâncime mică. În acest scop este util un vas Bellaplast sau un bazin fotografic cu fund canelat, cel din urmă, datorită canelurilor, împiedică deplasarea viermilor în câmpul de observație. Viermii tineri sunt fixați cu etanol (aproximativ 5 ml per probă duplicat). Vasele se umplu apoi cu apă până la un strat de 1-2 cm. Se adaugă câteva picături (200-300 µl) de roșu Bengal (soluție de 1 % în etanol) (0,5 % eozină este o altă opțiune) după care cele două componente se amestecă cu grijă. După 12 ore, viermii ar trebui să aibă pete de culoare roșiatică și ar trebui să fie ușor de numărat deoarece se vor afla pe suprafața substratului. Alternativ, amestecul substrat/alcool poate fi spălat printr-o sită (dimensiunea ochiurilor: 0,250 mm) înainte de numărarea viermilor. Utilizând această procedură, caolinitul, turba și o parte din nisip vor fi îndepărtate prin spălare, iar viermii de culoare roșiatică vor fi mai ușor de văzut și de numărat. Utilizarea unor lupe iluminate (dimensiune a lupei de 100 × 75 mm cu un factor de mărire de 2-3) va facilita, de asemenea, numărătoarea.

Tehnica colorării reduce timpul de numărare la câteva minute pentru fiecare vas și, orientativ, ar trebui să fie posibil ca o singură persoană să evalueze toate vasele din cadrul unui test în maximum două zile.

Extracția umedă

Extracția umedă trebuie începută imediat după încheierea testului. Solul din fiecare vas de testare se pune în site de plastic cu o dimensiune a ochiurilor de aproximativ 1 mm. Sitele se suspendă apoi în boluri de plastic, fără a atinge fundul. Bolurile se umplu atent cu apă până când probele din site se află în întregime sub suprafața apei. Pentru a asigura o rată de recuperare de peste 90 % dintre viermii prezenți, trebuie utilizată o perioadă de extracție de 3 zile la 20 ± 2 °C. La finalul perioadei de extracție, sitele se scot, iar apa (cu excepția unei cantități mici) se decantează ușor, având grijă să nu se agite sedimentul de pe fundul bolurilor. Ulterior, bolurile de plastic se agită ușor pentru a pune sedimentul în suspensie în apa de deasupra. Apa se transferă într-o cutie Petri și, după ce particulele de sol se depun, enchitreidele pot fi identificate, scoase și numărate utilizând un stereomicroscop și o pensetă fină din oțel.

Flotația

O metodă bazată pe flotație a fost descrisă într-o notă de R. Kuperman (4). După fixarea conținutului unui vas de testare cu etanol, solul se inundă cu Ludox (silice coloidală AM-30, suspensie apoasă de 30 % în greutate) până la 10-15 mm deasupra suprafeței solului. După o amestecare completă a solului cu agentul de flotație timp de 2-3 minute, viermii tineri care plutesc la suprafață pot fi numărați cu ușurință.

BIBLIOGRAFIE

(1) Korinkova, J. și Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. și Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

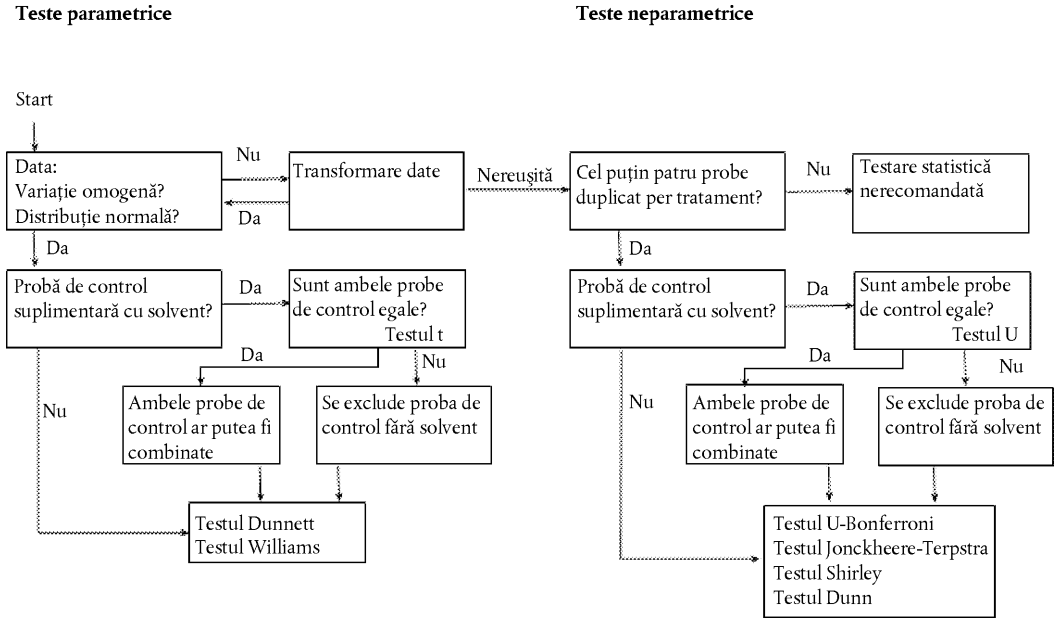
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. și Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. și Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Apendicele 7

Prezentare generală a evaluării statistice a datelor (determinarea NOEC)



▼M6

C.33. TEST DE REPRODUCERE A RÂMELOR (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 222 (2004). Aceasta este concepută pentru evaluarea efectelor substanțelor chimice din sol asupra ratei de reproducere (și a altor puncte finale subletale) a speciei de râme *Eisenia fetida* (Savigny 1826) sau *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Testul a făcut obiectul unui ring test (3). Există o metodă de testare a toxicității acute asupra râmelor (4). S-au publicat numeroase alte orientări internaționale și naționale pentru testele de toxicitate acută și cronică asupra râmelor (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida /Eisenia andrei* este considerat unul dintre reprezentanții faunei din sol și, în special, al râmelor. Sunt disponibile informații de referință privind ecologia râmelor și utilizarea acestora în cadrul testelor ecotoxicologice (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Râmele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare, fie amestecată în sol, fie, în cazul pesticidelor, aplicată în sau pe sol utilizând proceduri conforme cu modelul de utilizare a substanței chimice respective. Metoda de aplicare depinde de scopul testului. Seria de concentrații de testare este selectată pentru a include concentrațiile susceptibile de a cauza efecte subletale și letale pe parcursul unei perioade de opt săptămâni. Mortalitatea și efectele asupra creșterii la râmele adulte sunt determinate după 4 săptămâni de expunere. Adulții sunt apoi extrași din sol, iar efectele asupra reproducerii sunt evaluate după alte 4 săptămâni prin calcularea numărului de descendenți prezenți în sol. Rata de reproducere a râmelor expuse la substanța chimică de testare este comparată cu cea din proba (probele) de control în vederea determinării (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau a (ii) valorii EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}) utilizând un model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza o reducere cu x % a ratei de reproducere. Concentrațiile de testare trebuie să acopere valoarea EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}) astfel încât valoarea EC_x să fie mai degrabă interpolată decât extrapolată (pentru definiții, a se vedea apendicele 1).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

4. Trebuie să fie disponibile următoarele informații privind substanța chimică de testare pentru a putea defini procedurile de testare corespunzătoare:

   — solubilitatea în apă;

   — log K_{ow};

   — presiunea de vapori;

   — și informații privind evoluția și comportamentul în mediu, dacă este posibil (de exemplu, viteza de fotoliză și viteza de hidroliză în cazul în care acestea sunt relevante pentru modelele de aplicare).

5. Această metodă de testare se aplică tuturor substanțelor chimice de testare, indiferent de solubilitatea lor în apă. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, definite ca fiind substanțe chimice în cazul cărora constanta lui Henry sau coeficientul de partiție sol/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

6. Prezenta metodă de testare nu ia în considerare posibila degradare a substanței chimice de testare pe parcursul testului. În consecință, nu se poate garanta menținerea concentrațiilor de expunere la valorile inițiale pe tot parcursul testului. În acest caz, se recomandă efectuarea unei analize chimice a substanței chimice de testare la începutul și la finalul testului.

▼M6

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

7. Trebuie determinată valoarea NOEC și/sau EC_x a unei substanțe chimice de referință pentru a garanta caracterul adecvat al condițiilor de testare din laborator și pentru a verifica regularitatea în timp din punct de vedere statistic a răspunsului organismelor de testare. Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin o dată pe an sau, dacă testarea se desfășoară la o frecvență mai redusă, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare. Carbendazimul și benomilul reprezintă substanțe chimice de referință corespunzătoare care au demonstrat că afectează reproducerea (3). Trebuie observate efecte semnificative între (a) 1 și 5 mg de ingredient activ/kg de masă uscată sau (b) 250-500 g/ha sau 25-50 mg/m^2. În cazul în care un standard toxic pozitiv este inclus în seria de testare, se utilizează o singură concentrație, iar numărul de probe duplicat trebuie să fie același cu cel al probelor de control.

VALIDITATEA TESTULUI

8. Pentru ca rezultatul unui test să fie considerat valid, probele de control trebuie să îndeplinească următoarele criterii:

— fiecare probă duplicat (conținând 10 adulți) trebuie să fi produs ≥ 30 de exemplare tinere la finalul testului;

— coeficientul de variație al reproducerii trebuie să fie ≤ 30 %;

— rata mortalității în rândul adulților pe parcursul celor 4 săptămâni inițiale ale testului trebuie să fie ≤10 %.

În cazul în care un test nu îndeplinește criteriile de validitate de mai sus, testul trebuie încheiat, cu excepția cazului în care poate fi oferită o justificare pentru continuarea acestuia. Justificarea trebuie inclusă în raport.

DESCRIEREA TESTULUI

Echipamente

9. Trebuie utilizate recipiente de testare din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert cu o capacitate de aproximativ unu până la doi litri. Recipientele trebuie să aibă o secțiune orizontală de aproximativ 200 cm^2 astfel încât să se obțină o adâncime a substratului umed de aproximativ 5-6 cm atunci când se adaugă 500-600 g de masă uscată de substrat. Modelul capacului recipientului trebuie să permită schimbul de gaze între substrat și atmosferă și accesul luminii (de exemplu, prin intermediul unui capac transparent perforat) fără să permită ieșirea râmelor din recipient. În cazul în care cantitatea de substrat de testare utilizată este mult mai mare de 500-600 g per recipient de testare, numărul de râme trebuie crescut proporțional.

10. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă, în special, următoarele:

— dulap pentru uscare;

— stereomicroscop;

— pH-metru și fotometru;

— cântare de precizie adecvate;

— echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;

— echipamente adecvate pentru controlul umidității (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt prevăzute cu capace);

— incubator sau o cameră mică prevăzută cu sistem de climatizare;

— pensete, cârlige sau anse;

— baie de apă.

▼M6

Pregătirea solului artificial

11. În cadrul acestui test se utilizează un sol artificial (5)(7) având următoarea compoziție (pe baza greutății uscate, uscat la o temperatură de 105 C până la obținerea unei greutăți constante):

— 10 % mușchi de turbă (cu pH-ul cât mai apropiat posibil de valoarea de 5,5-6,0, fără reziduuri vizibile de plante, fin măcinat, uscat până la atingerea unui grad de umiditate măsurat);

— 20 % argilă caolinică (cu un conținut de caolinit de preferat mai mare de 30 %);

— 0,3-1,0 % carbonat de calciu ($CaCO_3$, pulverizat, de puritate analitică) pentru a obține un pH inițial de 6,0 ± 0,5.

— 70 % nisip cuarțos uscat cu aer (în funcție de cantitatea de $CaCO_3$ necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni.

Nota 1: cantitatea de $CaCO_3$ necesară va depinde de componentele substratului de sol, inclusiv hrana, și trebuie determinată prin măsurarea subeșantioanelor de sol chiar înainte de test. pH-ul este măsurat într-o probă amestecată într-o soluție 1 M de clorură de potasiu (KCl) sau într-o soluție de 0,01 M de clorură de calciu ($CaCl_2$) (13).*Nota 2:* conținutul de carbon organic al solului artificial poate fi redus, de exemplu, prin scăderea conținutului de turbă la 4-5 % și prin creșterea în consecință a conținutului de nisip. Printr-o astfel de reducere a conținutului de carbon organic, este posibil să scadă posibilitățile de absorbție a substanței chimice de testare în sol (carbon organic) și să crească disponibilitatea substanței chimice de testare pentru râme. S-a demonstrat că *Eisenia fetida* poate satisface criteriile de validitate privind reproducerea când este testată pe soluri naturale cu conținut mai scăzut de carbon organic (de exemplu 2,7 %) (14) și s-a constatat experimental că aceasta se poate obține și în soluri artificiale cu 5 % turbă. Prin urmare, nu este necesar ca înainte de utilizarea unui astfel de sol în cadrul unui test final să se demonstreze caracterul adecvat al solului artificial pentru a permite conformitatea testului cu criteriile de validitate, cu excepția cazului în care conținutul de turbă este mai mic decât valorile specificate mai sus.*Nota 3:* când se utilizează sol natural în cadrul unui test suplimentar (de exemplu, la un nivel superior), trebuie, de asemenea, să se demonstreze caracterul adecvat al solului și îndeplinirea criteriilor de validitate.

12. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare) într-un spațiu bine ventilat. Înainte de începerea testului, solul artificial uscat este umezit prin adăugarea de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, reprezentând între 40 % și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei (corespunzând cu 50 ± 10 % din masa uscată umezită). Astfel, se obține un substrat din care nu se scurge apă stătătoare sau liberă atunci când este strâns în mână. Capacitatea de retenție a apei (WHC) maximă a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 2, ISO 11274 (15) sau un standard UE echivalent.

13. În cazul în care substanța chimică de testare se aplică pe suprafața solului sau este amestecată în sol fără apă, cantitatea finală de apă poate fi amestecată în solul artificial în timpul pregătirii solului. În cazul în care substanța chimică de testare este amestecată în sol împreună cu o anumită cantitate de apă, se poate adăuga o cantitate de apă suplimentară în același timp cu substanța chimică de testare (a se vedea punctul 19).

14. Gradul de umiditate din sol este determinat la începutul și la finalul testului în conformitate cu ISO 11465 (16) sau cu un standard UE echivalent, iar pH-ul solului, în conformitate cu apendicele 3 sau cu ISO 10390 (13) sau cu un standard UE echivalent. Aceste determinări trebuie efectuate pe o probă

▼M6

de sol de control și pe o probă de sol cu fiecare concentrație de testare. pH-ul solului nu trebuie ajustat atunci când sunt testați acizi sau baze. Gradul de umiditate trebuie să fie monitorizat pe întreaga perioadă a testului prin cântărirea periodică a recipientelor (a se vedea punctele 26 și 30).

Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare

15. Specia utilizată în cadrul testului este *Eisenia fetida* sau *Eisenia andrei* (1)(2). Pentru a începe testul sunt necesare râmele adulte cu vârsta între două luni și un an și cu un clitellum. Râmele trebuie să fie selectate dintr-o cultură sincronizată cu o structură de vârstă relativ omogenă (apendicele 4). Exemplarele dintr-un grup de testare nu trebuie să difere din punctul de vedere al vârstei cu mai mult de 4 săptămâni.

16. Râmele selectate trebuie să se aclimatizeze timp de cel puțin o zi cu tipul de substrat de sol artificial pentru a fi utilizate în cadrul testului. În această perioadă râmele trebuie să fie hrănite cu același tip de hrană care va fi utilizat în cadrul testului (a se vedea punctele 31-33).

17. Grupuri de câte 10 râme trebuie cântărite individual, repartizându-le aleatoriu în recipientele de testare în momentul începerii testului. Râmele sunt spălate înainte de cântărire (cu apă deionizată), iar excesul de apă se îndepărtează prin așezarea pentru scurt timp a râmelor pe hârtie de filtru. Masa umedă a fiecărei râme trebuie să fie cuprinsă între 250 și 600 mg.

Pregătirea concentrațiilor de testare

18. Pot fi utilizate două metode de aplicare a substanței chimice de testare: amestecarea substanței chimice de testare în sol (a se vedea punctele 19-21) sau aplicarea pe suprafața solului (a se vedea punctele 22-24). Selectarea metodei adecvate depinde de scopul testului. În general, se recomandă amestecarea substanței chimice de testare în sol. Cu toate acestea, se pot impune proceduri de aplicare conforme cu practica agricolă obișnuită (de exemplu, pulverizarea preparatelor lichide sau utilizarea de preparate speciale de pesticide precum granule sau produse de tratare a semințelor). Solvenții utilizați pentru facilitarea tratamentului solului cu substanța chimică de testare trebuie selectați pe baza toxicității lor scăzute pentru râme și trebuie inclus în proiectul de testare un vas de control cu solvent (a se vedea punctul 27).

Amestecarea substanței chimice de testare în sol

Substanța chimică de testare solubilă în apă

19. O soluție a substanței chimice de testare este pregătită în apă deionizată, chiar înainte de începerea testului, într-o cantitate suficientă pentru toate probele duplicat cu aceeași concentrație. Poate fi necesar un cosolvent pentru a facilita prepararea soluției de testare. Este de preferat să se pregătească o cantitate de soluție necesară pentru a atinge gradul final de umiditate (între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei). Soluția este amestecată bine cu substratul de sol înainte de a fi introdusă într-un recipient de testare.

Substanța chimică de testare insolubilă în apă

20. Substanța chimică de testare se dizolvă într-un volum mic de solvent organic adecvat (de exemplu acetonă) și apoi este pulverizată pe o cantitate mică de nisip cuarțos fin sau este amestecată în acesta. Solventul este apoi eliminat prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin câteva minute. Nisipul tratat este apoi amestecat bine cu solul artificial umezit în prealabil. Se adaugă apoi apă deionizată (o cantitate necesară) pentru a atinge un grad final de umiditate cuprins între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei și se amestecă în sol. Solul este gata pentru a fi introdus în recipientele de testare. Trebuie să se aibă în vedere faptul că anumiți solvenți pot fi toxici pentru râme.

▼M6

Substanța chimică de testare insolubilă în apă și solvenți organici

21. Se prepară un amestec format din 10 g de nisip cuarțos industrial fin măcinat și o cantitate de substanță chimică de testare necesară pentru a atinge concentrația de testare în sol. Amestecul este apoi mixat bine cu solul artificial umezit în prealabil. Se adaugă apoi apă deionizată într-o cantitate necesară pentru a atinge un grad final de umiditate cuprins între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei și se amestecă în sol. Solul este gata pentru a fi introdus în recipientele de testare.

Aplicarea substanței chimice de testare pe suprafața solului

22. Solul este tratat după introducerea râmelor. Recipientele de testare sunt primele care trebuie umplute cu substratul de sol umezit, iar râmele cântărite sunt așezate pe suprafața acestuia. Râmele sănătoase pătrund în mod normal imediat în substrat și, prin urmare, orice râmă rămasă la suprafață după 15 minute este considerată bolnavă și trebuie înlocuită. Dacă râmele sunt înlocuite, cele noi și cele înlocuite trebuie cântărite astfel încât să se cunoască de la început greutatea totală în viu a grupului de râme destinate expunerii și greutatea totală a recipientului cu râme.

23. Se aplică substanța chimică de testare. Aceasta nu trebuie să fie adăugată la sol în prima jumătate de oră de la introducerea râmelor (sau dacă râmele sunt prezente pe suprafața solului), pentru a se evita orice expunere directă la substanța chimică de testare prin contact cutanat. Atunci când substanța chimică de testare este un pesticid, poate fi adecvată aplicarea acesteia pe suprafața solului prin pulverizare. Substanța chimică de testare trebuie aplicată pe suprafața solului, în mod cât mai uniform posibil, cu ajutorul unui dispozitiv de pulverizare de laborator pentru a simula pulverizarea pe teren. Înainte de aplicare capacul recipientului de testare trebuie să fie îndepărtat și înlocuit cu un înveliș care protejează pereții laterali ai recipientului în timpul pulverizării. Învelișul poate fi realizat dintr-un recipient de testare de la care a fost îndepărtată baza. Aplicarea trebuie să aibă loc la o temperatură de 20 ± 2 °C și pentru soluțiile apoase, emulsii sau dispersii la o rată de aplicare a apei cuprinsă între 600 și 800 $\mu l/m^2$. Rata trebuie să fie verificată cu ajutorul unei tehnici de calibrare adecvate. Preparatele speciale precum granulele sau produsele de tratare a semințelor trebuie aplicate într-un mod similar cu modul de aplicare în agricultură.

24. Recipientele de testare trebuie să fie lăsate neacoperite timp de o oră pentru a permite oricărui solvent volatil asociat cu aplicarea substanței chimice de testare să se evapore. Trebuie avut grijă ca nicio râmă să nu scape din vasele de testare în perioada respectivă.

PROCEDURA

Grupuri de testare și vase de control

25. Se recomandă introducerea a 10 râme în 500-600 g de masă uscată de sol artificial (de exemplu, 50-60 g de sol per râmă). Dacă se utilizează cantități mari de sol, ca în cazul testării pesticidelor cu moduri speciale de aplicare, cum ar fi produsele de tratare a semințelor, cantitatea de 50-60 g de sol per râmă trebuie menținută prin creșterea numărului de râme. Se pregătesc zece râme pentru fiecare recipient de control și de tratament. Râmele sunt spălate cu apă și șterse și sunt așezate apoi pe hârtie absorbantă pentru o perioadă scurtă pentru a permite scurgerea excesului de apă.

26. Pentru a evita erorile sistematice în distribuirea râmelor în recipientele de testare, omogenitatea populației de testare trebuie să fie determinată prin cântărirea individuală a 20 de râme prelevate aleatoriu din populația din care vor fi selectate râmele pentru testare. După asigurarea omogenității, loturile de râme sunt apoi selectate, cântărite și distribuite în recipientele de testare utilizând o procedură de randomizare. După adăugarea râmelor de

▼M6

testare, fiecare recipient de testare trebuie să fie cântărit pentru a se asigura că există o greutate inițială care poate fi utilizată ca bază pentru monitorizarea gradului de umiditate a solului pe toată durata testului, conform descrierii de la punctul 30. Recipientele de testare sunt apoi acoperite conform descrierii de la punctul 9 și așezate în camera de testare.

27. Sunt pregătite vase de control corespunzătoare pentru fiecare dintre metodele de aplicare a substanței chimice de testare descrise la punctele 18-24. Pentru pregătirea probelor de control sunt urmate procedurile relevante descrise, fără a se adăuga substanța chimică de testare. Astfel, dacă este cazul, se adaugă în probele de control solvenți organici, nisip cuarțos sau alți dizolvanți în concentrații/cantități echivalente cu cele utilizate în vasele de tratament. Atunci când se utilizează un solvent sau un alt dizolvant pentru a adăuga substanța chimică de testare, trebuie pregătită și testată, de asemenea, o probă de control suplimentară fără dizolvant sau substanța chimică de testare pentru a se asigura că dizolvantul nu influențează rezultatele testului.

Condiții de testare

28. Temperatura de testare este de 20 ± 2 °C. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în zona recipientelor de testare.

29. Recipientele de testare nu sunt aerate în timpul testului, dar modelul capacelor vaselor de testare trebuie să ofere posibilitatea schimbului de gaze, limitând totodată evaporarea umezelii (a se vedea punctul 9).

30. Conținutul de apă al substratului de sol în recipientele de testare este menținut pe toată durata testului prin recântărirea periodică a recipientelor de testare (fără capacele acestora). Dacă este necesar, pierderile sunt compensate cu apă deionizată. Conținutul de apă nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % față de cel de la începutul testului.

Hrănirea

31. Este considerat acceptabil orice tip de hrană de o calitate considerată adecvată cel puțin pentru menținerea greutății râmelor în timpul testului. Experiența a demonstrat că fulgii de ovăz și gunoiul de grajd provenit de la bovine sau cabaline constituie o hrană adecvată. Trebuie efectuate verificări pentru a se asigura că bovinele sau cabalinele de la care este obținut gunoiul de grajd nu sunt supuse unui tratament cu medicamente sau cu substanțe chimice, cum ar fi hormoni de creștere, nematocide sau produse de uz veterinar similare care ar putea afecta negativ râmele în timpul testului. Se recomandă colectarea individuală de gunoi de grajd de la bovine, deoarece experiența a arătat că gunoiul de grajd disponibil pe piață, utilizat ca îngrășământ de grădină, poate avea efecte adverse asupra râmelor. Gunoiul de grajd trebuie uscat cu aer, măcinat fin și pasteurizat înainte de utilizare.

32. Înainte de a fi utilizat în cadrul unui test, fiecare lot proaspăt de hrană trebuie administrat unei culturi de râme netestate pentru a se asigura că acesta este de o calitate corespunzătoare. Creșterea și producția de coconi nu trebuie reduse în comparație cu cele ale râmelor crescute într-un substrat care nu conține lotul nou de hrană [condițiile descrise în metoda de testare C.8(4)].

33. Hrana se administrează prima dată la o zi după introducerea râmelor și aplicarea substanței chimice de testare în sol. Aproximativ 5 g de hrană sunt distribuite pe suprafața solului din fiecare recipient și sunt umezite cu apă deionizată (aproximativ între 5 ml și 6 ml per recipient). Ulterior, hrana se administrează o dată pe săptămână pe parcursul perioadei de testare

▼M6

de 4 săptămâni. În cazul în care există resturi de hrană neconsumată, rația trebuie redusă astfel încât să se evite dezvoltarea de ciuperci sau apariția de infecții fungice. Adulții sunt extrași din sol în cea de a 28-a zi a testului. Alte 5 g de hrană sunt apoi administrate în fiecare recipient de testare. Nu se mai administrează hrană pe parcursul celor 4 săptămâni rămase ale testului.

Selectarea concentrațiilor de testare

34. Informațiile anterioare cu privire la toxicitatea substanței chimice de testare, provenite, de exemplu, dintr-un test de toxicitate acută (4) și/sau dintr-o serie de studii de stabilire a intervalului, ar trebui să faciliteze selectarea concentrațiilor de testare adecvate. Dacă este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului, de exemplu, cu cinci concentrații de 0,1, 1,0, 10, 100 și 1 000 mg/kg (masă uscată a solului). Este suficientă o probă duplicat pentru fiecare tratament și pentru fiecare probă de control. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni, iar rata mortalității este evaluată la finalul testului.

Proiectul experimentului

35. Întrucât nu poate fi prescris pentru test niciun rezumat statistic, prezenta metodă de testare oferă instrucțiuni pentru determinarea valorilor NOEC și EC_x. Un calcul al NOEC ar putea fi solicitat de autoritățile de reglementare în viitorul apropiat. O utilizare pe scară mai largă a EC_x, determinată de rațiuni de natură statistică și ecologică, ar putea fi adoptată în viitorul apropiat. În consecință, sunt propuse trei modele, bazate pe recomandările formulate în urma unui ring test privind o metodă de testare a reproducerii enchitreidelor (17).

36. Pentru stabilirea intervalului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

— Pentru determinarea valorii NOEC, trebuie testate cel puțin cinci/douăsprezece concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 2,0.

— Pentru determinarea valorii EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}), se recomandă utilizarea unui număr adecvat de concentrații pentru a obține cel puțin patru răspunsuri medii semnificativ diferite din punct de vedere statistic la aceste concentrații. Se recomandă cel puțin două probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și șase probe duplicat de control. Factorul de separare poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în seria de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrațiile cele mai mari și cele mai scăzute.

— O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și EC_x. Trebuie utilizate opt concentrații de tratament în serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare tratament și opt probe de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

Durata testului și măsurători

37. În cea de a 28-a zi, râmele adulte vii sunt observate și numărate. Se înregistrează, de asemenea, orice comportament neobișnuit (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată) și orice modificare a morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise). Toate râmele adulte se scot apoi din vasele de testare și sunt numărate și cântărite. Transferul, înainte de evaluare, al solului care conține râmele într-o tavă curată poate facilita căutarea adulților. Râmele extrase din sol trebuie spălate înainte de cântărire (cu apă deionizată), iar excesul de apă se îndepărtează prin așezarea pentru scurt timp a râmelor pe hârtie de filtru. Toate râmele care nu sunt găsite în această perioadă sunt înregistrate ca moarte, întrucât se presupune că respectivele râme au murit și s-au descompus înainte de evaluare.

▼M6

38. În cazul în care a fost scos din recipiente, solul trebuie apoi reintrodus în acestea (fără râmele adulte, însă cu toți coconii produși). Solul este apoi incubat timp de patru săptămâni suplimentare în aceleași condiții de testare, cu excepția faptului că hrana este administrată doar la începutul acestei faze a testului (a se vedea punctul 33).

39. La finalul celei de a doua perioade de 4 săptămâni, se determină numărul de exemplare tinere eclozate din coconii din solul de testare și numărul de coconi utilizându-se procedurile descrise în apendicele 5. Toate semnele de rănire sau de vătămare a râmelor trebuie, de asemenea, înregistrate pe tot parcursul perioadei de testare.

Test la valori-limită

40. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere va fi efectuat sub forma unui test la valori-limită, utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg. Un test la valori-limită va oferi posibilitatea de a demonstra că NOEC pentru reproducere este mai mare decât concentrația-limită, diminuând în același timp numărul râmelor utilizate în cadrul testului. Trebuie utilizate opt probe duplicat atât pentru solul tratat, cât și pentru proba de control.

DATE ȘI RAPORT

Prelucrarea rezultatelor

41. Cu toate că în apendicele 6 este furnizată o prezentare generală, în cadrul prezentei metode de testare nu este oferită nicio orientare statistică definitivă pentru analiza rezultatelor testului.

42. Unul dintre punctele finale este mortalitatea. Cu toate acestea, modificările comportamentului (de exemplu, incapacitatea de a săpa în sol; poziția nemișcată pe peretele de sticlă al vasului de testare) și ale morfologiei (de exemplu, prezența unor răni deschise) râmelor adulte trebuie, de asemenea, înregistrate împreună cu prezența oricărui exemplar tânăr. De obicei, trebuie aplicată analiza probit (18) sau regresia logistică pentru determinarea LC_{50}. Cu toate acestea, în cazurile în care această metodă de analiză nu este adecvată (de exemplu, dacă sunt disponibile mai puțin de trei concentrații având ca efect mortalitatea parțială), pot fi utilizate metode alternative. Aceste metode ar putea include mediile mobile (19), metoda simplificată Spearman-Karber (20) sau simpla interpolare (de exemplu, media geometrică a LC_0 și LC_{100}, calculată prin înmulțirea rădăcinii pătrate a LC_0 cu LC_{100}).

43. Celălalt punct final este fecunditatea (de exemplu, numărul de exemplare tinere produse). Cu toate acestea, ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne de nocivitate trebuie înregistrate în raportul final. Pentru a calcula rezultatele reproducerii, analiza statistică necesită cunoașterea mediei aritmetice $\bar{x}$ și a abaterii standard per tratament și per probă de control.

44. Dacă s-a efectuat o analiză a variației, abaterea standard, s, și gradele de libertate (df) pot fi înlocuite de estimarea variației combinate obținute din ANOVA și, respectiv, de gradele sale de libertate, cu condiția ca varianța să nu depindă de concentrație. În acest caz, se utilizează variațele unice ale probelor de control și ale probelor supuse tratamentului. Respectivele valori se calculează de obicei cu ajutorul unui software statistic comercial utilizând ca duplicat rezultatele pentru fiecare vas. În cazul în care combinarea datelor pentru probele de control negative și pentru probele de control cu solvent pare rezonabilă în locul testării în funcție de una dintre ele, acestea trebuie testate pentru a vedea dacă nu diferă în mod semnificativ (pentru testul adecvat, a se vedea punctul 47 și apendicele 6).

45. Testarea statistică și inferența suplimentare depind de distribuția normală și omogenitatea în ceea ce privește varianța ale valorilor duplicate.

▼M6

Estimarea NOEC

46. Ar fi de preferat aplicarea unor teste puternice. Trebuie utilizate informații, de exemplu, din experiența anterioară din cadrul ring testelor sau alte date istorice cu privire la distribuția aproximativ normală a datelor. Omogenitatea variației (omoscedasticitatea) este mai critică. Experiența arată că varianța crește adesea odată cu creșterea mediei. În aceste cazuri, o transformare a datelor ar putea duce la omoscedasticitate. Cu toate acestea, o astfel de transformare trebuie să se bazeze pe experiența legată de datele istorice mai degrabă decât pe datele supuse analizei. Cu date omogene, ar trebui efectuate teste t multiple cum ar fi testul Williams (α = 0,05, unilateral) (21)(22) sau, în anumite cazuri, testul lui Dunnett (23)(24). Trebuie remarcat faptul că, în cazul unei duplicări inegale, valorile t din tabel trebuie corectate astfel cum sugerează Dunnett și Williams. Uneori, din cauza variației mari, răspunsurile nu cresc/descresc în mod regulat. În acest caz de abatere puternică de la monotonicitate, testul lui Dunnett este mai adecvat. În cazul în care există abateri de la omoscedasticitate, ar putea fi rezonabilă analizarea mai aprofundată a posibilelor efecte asupra variațelor pentru a decide dacă testele t pot fi aplicate fără a pierde multă putere (25). În mod alternativ, un test U multiplu, de exemplu testul U al lui Bonferroni potrivit Holm (26), sau, când aceste date prezintă heteroscedasticitate, dar din alte puncte de vedere corespund unei relații doză-răspuns monotonă subiacentă, poate fi aplicat un alt test neparametric [de exemplu, Jonckheere-Terpstra (27) (28) sau Shirley (29) (30)] și ar fi în general de preferat testelor t cu varianță inegală. (a se vedea, de asemenea, schema din apendicele 6).

47. Dacă s-a efectuat un test la valori-limită, iar premisele procedurilor de testare parametrică (normalitate, omogenitate) sunt îndeplinite, poate fi utilizat testul t (Student) pe perechi sau testul U Mann-Whitney (31).

Estimarea EC_x

48. Pentru a calcula orice valoare a EC_x, se utilizează mediile pentru fiecare tratament pentru analiza regresiei (liniară sau neliniară), după obținerea unei funcții doză-răspuns. Pentru creșterea râmelor ca răspuns continuu, valorile EC_{x-} pot fi estimate utilizând o analiză de regresie adecvată (32). Printre funcțiile potrivite pentru datele binare (mortalitate/supraviețuire) și număr de descendenți produs se numără funcția sigmoidă normală, funcția logistică și funcția Weibull, conținând doi sau patru parametri, dintre care unii pot modela și răspunsurile hormetice. Dacă s-a stabilit o funcție doză-răspuns prin analiză de regresie liniară, trebuie identificat un r^2 (coeficient de determinare) și/sau o pantă semnificativă în analiza de regresie înainte de a estima EC_x prin introducerea unei valori corespunzătoare x % din media probelor de control în ecuația obținută prin analiza de regresie. Limitele de încredere de 95 % se calculează după metoda lui Fieller [citată de Finney (18)] sau după alte metode moderne adecvate.

49. Alternativ, răspunsul se modelează ca procentaj sau proporție din parametrul modelului, care se interpretează ca răspuns mediu al probelor de control. În aceste cazuri, curba sigmoidă normală (logistică, Weibull) poate fi adesea ajustată la rezultate utilizând procedura de regresie probit (18). În aceste cazuri, funcția de ponderare trebuie ajustată pentru răspunsurile metrice potrivit lui Christensen (33). Cu toate acestea, dacă se observă o ormeză, analiza probit ar trebui înlocuită cu o funcție logistică sau Weibull cu patru parametri, stabilită printr-o procedură de regresie neliniară (34). Dacă este imposibilă ajustarea unei funcții doză-răspuns adecvate la date, se pot utiliza metode alternative de estimare a EC_x și a limitelor sale de încredere, cum ar fi mediile mobile după Thompson (19) și procedura Spearman-Karber simplificată (20).

RAPORTUL DE TESTARE

50. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

▼M6

Substanța chimică testată:

— o descriere definitivă a substanței chimice de testare, lotul de fabricație, lotul de ambalare și numărul CAS, puritatea;

— proprietățile substanței chimice de testare [de exemplu, log Kow, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și informații privind evoluția și comportamentul].

Organismele de testare:

— animalele de testare utilizate: specii, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de creștere;

— vârsta, intervalul de dimensiune (masa) al organismelor de testare.

Condițiile de testare

— detalii privind pregătirea solului de testare;

— capacitatea maximă a solului de retenție a apei;

— o descriere a tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice de testare în sol;

— detalii privind substanțele chimice auxiliare utilizate pentru administrarea substanței chimice de testare;

— detalii privind calibrarea echipamentului de pulverizare, dacă este cazul;

— descrierea protocolului și a procedurii de testare;

— dimensiunea recipientelor de testare și volumul solului de testare;

— condițiile de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;

— o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;

— pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și la sfârșitul testului.

Rezultatele testului:

— mortalitatea în rândul adulților (%) în fiecare recipient de testare la finalul primelor 4 săptămâni ale testului;

— masa totală a adulților la începutul testului în fiecare recipient de testare;

— modificările de greutate corporală ale adulților vii (% din greutatea inițială) din fiecare recipient de testare după primele patru săptămâni ale testului;

— numărul de exemplare tinere produse în fiecare recipient de testare la sfârșitul testului;

— o descriere a simptomelor evidente sau patologice sau a schimbărilor clare de comportament;

— rezultatele obținute cu substanța chimică de testare de referință;

— valorile LC_{50}, NOEC și/sau EC_x (de exemplu, EC_{50}, EC_{10}) pentru reproducere, în cazul în care unele dintre acestea sunt aplicabile cu intervale de încredere și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea acestora, toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor;

— un grafic al raportului doză/răspuns;

— rezultatele aplicabile fiecărui recipient de testare;

Abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

BIBLIOGRAFIE

(1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*” is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. și J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Oblig. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 – 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. În: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Capitolul C.8 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe râme.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. și J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. În: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo și R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Toxicol. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. și F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. și Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. și J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

În cadrul prezentei metode de testare se aplică următoarele definiți:

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„EC_x” (concentrația efectivă pentru un efect de x %) reprezintă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC_{50} reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite. În cadrul prezentului test concentrațiile efective sunt exprimate ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului.

„LC_0” (concentrație neletală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care nu ucide niciunul dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC_0 este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LC_{50}” (concentrație medie letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 50 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test LC_{50} este exprimată ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului.

„LC_{100}” (concentrație în întregime letală) este concentrația unei substanțe chimice de testare care ucide 100 % dintre organismele de testare expuse pe parcursul unei perioade date. În cadrul prezentului test, LC_{100} este exprimată ca masă a substanței chimice de testare per masă uscată de sol de testare.

„LOEC” (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) reprezintă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare care prezintă un efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$). În cadrul prezentului test LOEC este exprimată ca masă a substanței chimice de testare raportată la masa uscată a solului de testare sau ca masă a substanței chimice de testare per unitate de suprafață a solului. Toate concentrațiile de testare mai mari de LOEC trebuie să indice în mod normal un efect diferit din punct de vedere statistic de cel observat în cazul probei de control. Orice abatere de la cele sus-menționate trebuie justificată în raportul de testare.

„NOEC” (concentrația la care nu se observă niciun efect) reprezintă cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare aflată imediat sub LOEC în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

Rată de reproducere: numărul mediu de exemplare tinere de râme produs raportat la numărul de adulți pe parcursul perioadei de testare.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

▼**M6**

Apendicele 2

Determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei (WHC) este considerată a fi una adecvată. Aceasta este descrisă în anexa C la ISO DIS 11268-2 (1).

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru, se umple cu apă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită și uscată la o temperatură de 105 °C până ce se atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC (în \% din masa uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat în apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

BIBLIOGRAFIE:

(1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Apendicele 3

Determinarea pH-ului solului

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (1).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ($CaCl_2$) 0,01 M de puritate analitică. Ulterior, suspensia se agită bine timp de cinci minute și este lăsată să se sedimenteze timp de cel puțin 2 ore, însă nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).

BIBLIOGRAFIE:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Apendicele 4

Creşterea *Eisenia fetida/Eisenia andrei*

Creşterea este preferabil să fie efectuată într-o cameră climatică la o temperatură 20 °C ± 2 °C. La această temperatură şi cu o cantitate de hrană suficientă, râmele devin mature după aproximativ 2-3 luni.

Ambele specii pot fi înmulţite într-o gamă largă de deşeuri animale. Mediul de înmulţire recomandat este un amestec 50:50 gunoi de grajd provenit de la cai sau de la bovine şi turbă. Trebuie realizate verificări pentru a se asigura că bovinele sau caii de la care este obţinut gunoiul de grajd nu sunt supuse unui tratament cu medicamente sau cu substanţe chimice, cum ar fi hormoni de creştere, nematocide sau produse de uz veterinar similare care ar putea afecta negativ râmele în timpul testului. Se recomandă colectarea individuală de gunoi de grajd dintr-o sursă „ecologică", deoarece experienţa a arătat că gunoiul de grajd disponibil pe piaţă utilizat ca îngrăşământ de grădină poate avea efecte adverse asupra râmelor. Mediul trebuie să aibă o valoare a pH-ului de aproximativ 6-7 (ajustată cu carbonat de calciu), o conductivitate ionică scăzută (mai puţin de 6 mS/cm sau o concentraţie de sare de 0,5 %) şi nu trebuie să fie contaminat excesiv cu amoniac sau urină de origine animală. Substratul trebuie să fie umed, dar nu prea ud. Sunt recomandate cutii pentru înmulţire cu o capacitate de 10-50 litri.

Pentru a se obţine râme cu o vârstă şi o dimensiune (masă) standard, cel mai bine este să se înceapă cu creşterea de coconi. Odată ce cultura a fost creată, aceasta este menţinută prin plasarea de râme adulte într-o cutie de înmulţire cu substrat proaspăt între 14 zile şi 28 de zile pentru a permite producerea altor coconi. Adulţii sunt apoi îndepărtaţi şi exemplarele tinere produse din coconi sunt utilizate ca bază pentru cultura următoare. Râmele sunt hrănite continuu cu deşeuri animale şi transferate la anumite intervale de timp în substrat proaspăt. Experienţa a demonstrat gunoiul de grajd provenit de la bovine sau cai, uscat cu aer şi fin mărunţit sau fulgii de ovăz constituie o hrană adecvată. Trebuie să se asigure că bovinele sau caii de la care este obţinut gunoiul de grajd nu sunt supuşi unui tratament cu medicamente sau cu substanţe chimice, cum ar fi hormoni de creştere, care ar putea afecta negativ râmele dintr-o cultură pe termen lung. Râmele eclozate din coconi sunt utilizate pentru teste atunci când au vârsta între 2 şi 12 luni şi sunt considerate adulte.

Râmele pot fi considerate sănătoase dacă se deplasează prin substrat, nu încearcă să părăsească substratul şi se reproduc continuu. Epuizarea substratului este indicată de râmele care se deplasează foarte încet şi care au o extremitate posterioară galbenă. În acest caz, se recomandă furnizarea de substrat proaspăt şi/sau o reducere a densităţii populaţiei de râme.

▼M6

Apendicele 5

Tehnici de numărare a exemplarelor tinere de râme eclozate din coconi

Sortarea manuală a râmelor din substratul sol necesită foarte mult timp. Prin urmare, sunt recomandate două metode alternative:

(a) Recipientele de testare sunt plasate într-o baie de apă inițial la o temperatură de 40 °C, dar care ajunge până la 60 °C. După o perioadă de aproximativ 20 de minute, exemplarele tinere de râme ar trebui să apară la suprafața solului de unde pot fi ușor extrase și numărate.

(b) Solul de testare poate fi strecurat printr-o sită utilizând metoda dezvoltată de van Gestel et al. (1), cu condiția ca turba și gunoiul de grajd sau fulgii de ovăz adăugați în sol să fi fost măcinați într-o pulbere fină. Două site cu ochiuri de 0,5 mm (diametru de 30 cm) sunt așezate una peste cealaltă. Conținutul unui recipient de testare este strecurat prin site sub un jet puternic de apă de la robinet, astfel încât exemplarele tinere de râme și coconii să rămână în principal în sita superioară. Este important de remarcat faptul că întreaga suprafață a sitei superioare trebuie menținută umedă în timpul acestei operațiuni, astfel încât exemplarele tinere de râme vor pluti pe o peliculă de apă, împiedicându-le astfel să strecoare prin ochiurile sitelor. Cele mai bune rezultate se obțin atunci când se utilizează un duș.

După ce întregul substrat de sol a fost strecurat prin sită, exemplarele tinere și coconii pot fi transferați prin clătire din sita superioară într-un bol. Conținutul bolului este apoi lăsat deoparte pentru a permite coconilor goi să plutească pe suprafața apei și coconilor plini și exemplarelor tinere de râme să cadă pe fundul bolului. Apa din bol poate a fi apoi scursă, iar exemplarele tinere de râme și coconii pot fi transferați într-un vas Petri conținând puțină apă. Râmele pot fi extrase pentru a fi numărate cu ajutorul unui ac sau al unei pensete.

Experiența a demonstrat că metoda (a) este mai potrivită pentru extragerea exemplarelor tinere de râme care ar putea fi strecurate cu ajutorul unei site cu ochiuri de 0,5 mm.

Eficiența metodei utilizate pentru a extrage râmele (și coconii, după caz) din substratul de sol trebuie să fie întotdeauna determinată. În cazul în care exemplarele tinere sunt colectate cu ajutorul tehnicii de sortare manuală este recomandabil ca operațiunea să se efectueze de două ori pe toate probele.

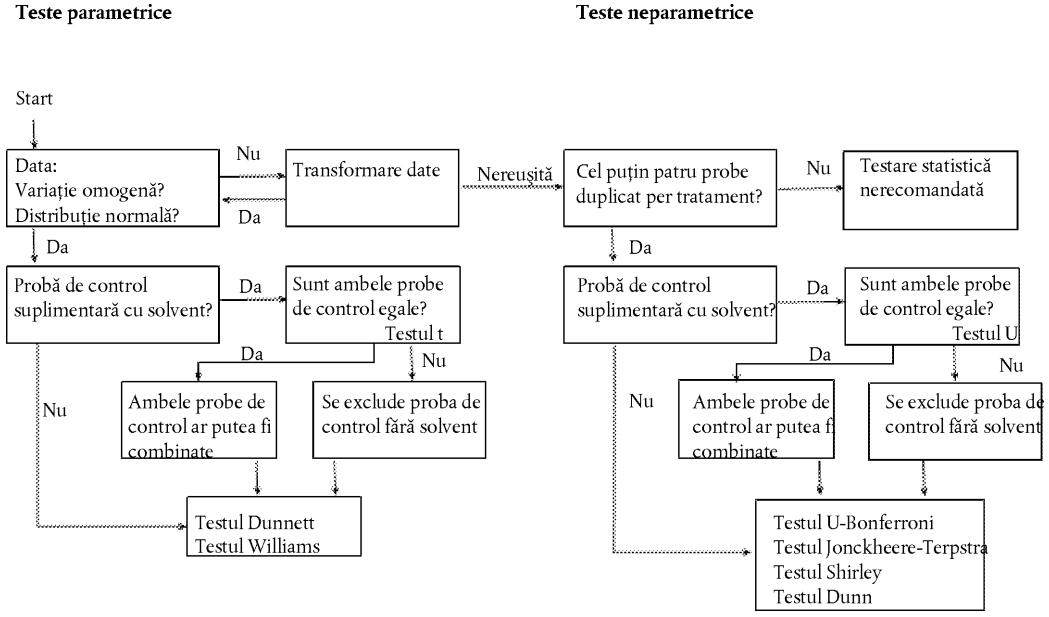
BIBLIOGRAFIE:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Apendicele 6

Prezentare generală a evaluării statistice a datelor (determinarea NOEC)



▼M6

C.34. DETERMINAREA INHIBĂRII ACTIVITĂȚII BACTERIILOR ANAEROBE – REDUCEREA PRODUCȚIEI DE GAZE PROVENITE DIN NĂMOL (DE EPURARE) SUPUS PROCESULUI DE DIGESTIE ANAEROBĂ

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 224 (2007). Substanțele chimice eliminate în mediul acvatic traversează zonele aerobe și cele anaerobe, unde pot fi degradate și/sau pot inhiba activitatea bacteriană; în anumite cazuri acestea pot rămâne în zone anaerobe timp de decenii sau pentru o perioadă mai lungă fără să sufere modificări. În tratarea apelor uzate, prima etapă, decantarea primară, este aerobă în lichidul supernatant și anaerobă în nămolul subnatant. Aceasta este urmată în cea de a doua etapă de o zonă aerobă într-un bazin de aerare a nămolului activat și de o zonă anaerobă în nămolul subnatant în bazinul de decantare secundar. Nămolul rezultat din aceste două etape este supus de obicei unui tratament anaerob, producând metan și dioxid de carbon care se utilizează în mod obișnuit pentru producerea de energie electrică. Într-un mediu mai larg, substanțele chimice care ajung în sedimentele din golfuri, estuare și mare sunt susceptibile de a rămâne în aceste zone anaerobe pentru o perioadă nedeterminată dacă nu sunt biodegradabile. Proporții mai mari din anumite substanțe chimice vor ajunge în special în aceste zone din cauza proprietăților lor fizice precum solubilitatea scăzută în apă, adsorbția ridicată în solidele în suspensie, precum și imposibilitatea de a fi biodegradate aerobic.

2. Cu toate că este de preferat ca substanțele chimice eliminate în mediu să fie biodegradabile atât în condiții aerobice, cât și în condiții anaerobice, este esențial ca respectivele substanțe să nu inhibe activitatea microorganismelor în niciuna dintre zone. În Regatul Unit, au existat câteva cazuri de inhibiție completă a producției de metan cauzată, de exemplu, de pentaclorfenolul prezent în emisiile industriale, determinând costuri foarte mari de transport al nămolului inhibat de la fierbător către locurile „sigure” și de import de nămol de digestie necontaminat provenit de la instalații învecinate. Însă există numeroase cazuri de întreruperi mai puțin drastice a digestiei de multe alte substanțe chimice, inclusiv de hidrocarburi alifatice halogene (curățare chimică) și detergenți, conducând la o afectare a eficienței fierbătoarelor.

3. Doar o singură metodă, C.11 (1), abordează inhibarea activității bacteriene (Respirația de nămol activ) și evaluează efectul substanțelor chimice de testare asupra vitezei de absorbție a oxigenului în prezența unui substrat. Metoda a fost utilizată pe scară largă în vederea avertizării timpurie cu privire la posibilele efecte nocive ale substanțelor chimice asupra tratamentului aerob al apelor uzate, precum și pentru indicarea concentrațiilor neinhibitoare ale substanțelor chimice de testare care urmează să fie utilizate în diferite teste de biodegrabilitate. Metoda de testare C.43 (2) oferă o posibilitate limitată pentru determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare asupra producției de gaz prin nămol anaerob, diluat de zece ori față de concentrația sa normală de solide pentru a obține precizia necesară în evaluarea procentajului de biodegradare. Întrucât nămolul diluat ar putea fi mai sensibil la substanțe chimice inhibitoare, grupul ISO a decis să elaboreze o metodă bazată pe utilizarea de nămol nediluat. Au fost examinate cel puțin trei texte (din Danemarca, Germania și Regatul Unit) și, în cele din urmă, au fost elaborate două standarde ISO, unul bazat pe utilizarea de nămol nediluat, ISO 13 641-1 (3), și celălalt bazat pe utilizarea de nămol diluat de o sută de ori, ISO 13 641-2 (4), în scopul reprezentării mâlului și a sedimentelor cu populații de bacterii reduse. Ambele metode a fost supuse unui ring test (5); partea 1 a fost recunoscută ca un standard acceptabil, însă în cazul părții 2 nu s-a ajuns la un acord. Regatul Unit a considerat că, din cauză că o proporție semnificativă dintre participanți au raportat o producție de gaz foarte mică sau nulă, parțial deoarece proporția de spațiu gazos era prea mare (de 75 %) pentru o sensibilitate optimă, metoda trebuie să fie reexaminată.

4. Lucrările anterioare din Regatul Unit (6)(7) descriau o metodă manometrică bazată pe nămol de digestie nediluat la care se adaugă nămol de epurare ca substrat, în recipiente de 500 ml; aparatura era ancombrantă, iar mirosul nămolului brut era insuportabil. Ulterior, aparatura mi compactă și mai practică a Shelton și Tiedje (8), dezvoltată de Battersby și Wilson (9) a

▼M6

fost aplicată cu succes de Wilson et al. (10). Kawahara et al. (11) a reuşit să prepare în laborator nămol standard mai omogen pentru a fi utilizat în cadrul unor teste de biodegrabilitate anaerobă şi de inhibare pe mai multe substanţe chimice. De asemenea, nămolul brut ca substrat a fost înlocuit pentru efectuarea unui test fie cu nămol anaerob diluat de o sută de ori, fie cu mâl, sedimente etc. cu activitate bacteriană redusă.

5. Această metodă poate furniza informaţii utile pentru a prevedea eventualul efect a unei substanţe chimice de testare asupra producţiei de gaz în fierbătoare anaerobe. Cu toate acestea, numai testele mai lungi care simulează funcţionarea mai detaliată a fierbătoarelor pot indica dacă adaptarea microorganismelor la substanţa chimică de testare se poate realiza sau dacă substanţele chimice susceptibile de a fi absorbite şi adsorbite în nămol se pot acumula până la atingerea unei concentraţii toxice pentru o perioadă mai lungă decât cea permisă în cadrul acestui test.

PRINCIPIUL TESTULUI

6. Alicotele cu un amestec de nămol supus unui proces de digestie anaerobă (20 g/l-40 g/l de solide totale) şi o soluţie de substrat degradabil sunt incubate individual şi simultan cu o serie de concentraţii ale substanţei chimice de testare în vase ermetice pentru o perioadă de până la trei zile. Cantitatea de gaz (metan plus dioxid de carbon) produsă este măsurată prin creşterea presiunii (Pa) în flacoane. Procentajul de inhibare a producţiei de gaze atribuit diferitelor concentraţii ale substanţei chimice de testare este calculat pe baza cantităţilor produse în flacoanele de testare şi de probă corespunzătoare. EC_{50} şi alte concentraţii sunt calculate pornind de la curbele procentajului de inhibare în funcţie de concentraţia substanţelor chimice de testare sau, cel mai adesea, de la logaritmul său.

INFORMAŢII PRIVIND SUBSTANŢA CHIMICĂ DE TESTARE

7. Substanţele chimice de testare trebuie utilizate în mod normal în forma cea mai pură uşor accesibilă, deoarece impurităţile din anumite substanţe chimice, de exemplu clorfenolii, pot fi mult mai toxice decât substanţa chimică în sine. Cu toate acestea, trebuie luată în considerare necesitatea testării substanţelor chimice în forma în care sunt produse/comercializate. Utilizarea de produse chimice preparate nu este recomandată în mod obişnuit, însă utilizarea de materiale preparate ar putea fi adecvată în cazul substanţelor chimice de testare cu solubilitate redusă. Proprietăţile substanţei chimice de testare care trebuie cunoscute includ solubilitatea în apă şi anumiţi solvenţi organici, presiunea de vapori, coeficientul de absorbţie, hidroliza şi biodegradabilitatea în condiţii anaerobe.

APLICABILITATEA METODEI

8. Testul se aplică substanţelor chimice solubile sau insolubile în apă, inclusiv substanţelor chimice volatile. Însă, trebuie acordată o atenţie sporită materialelor cu solubilitate scăzută în apă [a se vedea referinţa (12)] şi cu volatilitate ridicată. De asemenea, pot fi utilizaţi inoculi proveniţi din alte locuri anaerobe, de exemplu mâl, soluri saturate, sedimente. Sistemele bacteriene anaerobe care au fost anterior expuse la substanţe chimice toxice pot fi adaptate astfel încât activitatea lor să fie menţinută în prezenţa unor substanţe chimice xenobiotice. Inoculii din sistemele bacteriene adaptate pot indica o toleranţă mai mare la substanţele chimice de testare comparativ cu inoculii obţinuţi din sisteme neadaptate.

SUBSTANŢE CHIMICE DE REFERINŢĂ

9. Pentru a verifica procedura, se testează în paralel o substanţă chimică de referinţă prin pregătirea de vase corespunzătoare ca parte a ciclurilor testului normal; 3,5 diclorfenolul s-a dovedit a fi un inhibitor consecvent al producţiei de gaz anaerob, precum şi al consumului de oxigen de către nămolul activ şi de către alte reacţii biochimice. Două alte substanţe chimice s-au dovedit a fi mai inhibitoare pentru producţia de metan decât 3,5 diclorfenolul, şi anume bistiocianatul de metilen şi pentaclorfenolul, însă rezultatele cu acestea nu a fost validate. Pentaclorfenolul nu este recomandat deoarece este dificil de obţinut în formă pură.

▼M6

REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR

10. În cadrul unui ring test internațional (5), s-a realizat doar o reproductibilitate medie a valorilor EC_{50} obținute de cele 10 laboratoare pentru 3,5 diclorfenol și acid 2-brometan sulfonic. (Intervalul pentru primul a fost cuprins între 32mg/l și 502 mg/l, iar pentru cel de al doilea între 220 și 2 190 mg/l.)

Număr de laboratoare	În mg/l			În mg/g de nămol		
	medie	abatere standard	cv (%)	medie	abatere standard	cv (%)
	3,5-Diclorfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Acid 2-brometan sulfonic					
10	1 058	896	85	34	26	76

Date privind EC_{50} provenite din ring test – nămol nediluat

11. Coeficienții mari de variație dintre laboratoare reflectă în mare măsură diferențele de sensibilitate a microorganismelor din nămol care au fost sau nu au fost expuse în prealabil la substanța chimică de testare sau la alte substanțe înrudite din punct de vedere chimic. Precizia determinării valorii EC_{50} pe baza concentrației nămolului a fost cu puțin mai bună decât cea a valorii „volumetrice” (mg/l). Cele trei laboratoare care au raportat precizia valorilor lor EC_{50} pentru 3,5-diclorfenol au indicat coeficienți de variație mult mai mici (22, 9 și, respectiv, 18 % pentru EC_{50} mg/g) decât cei obținuți din mediile tuturor celor zece laboratoare. Mediile individuale ale celor trei laboratoare au fost de 3,1, 3,2 și, respectiv, 2,8 mg/g. Coeficienții de variație mai mici acceptabili din cadrul laboratoarelor în comparație cu coeficienții mult mai mari dintre valorile laboratoarelor, și anume 9-22 % față de 92 %, indică faptul că există diferențe semnificative între proprietățile nămolurilor individuale.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

12. Este necesară utilizarea echipamentelor obișnuite de laborator și a următoarelor:

a) Incubator – ignifug și cu temperatură controlată de 35 °C ± 2 °C;

b) Vase de testare din sticlă rezistentă la presiune de o dimensiune nominală corespunzătoare ([1]), fiecare prevăzut cu un sept impermeabil la gaze, capabil să suporte o presiune de aproximativ 2 bari sau de 2×10^5 Pa (învelișul utilizat va fi, de exemplu, din PTFE = politetrafluoretilenă). Se recomandă utilizarea de flacoane de ser de sticlă cu un volum nominal de 125 ml și un volum real de aproximativ 160 ml, etanșate cu septuri adaptate pentru flacoanele de ser ([2]) și cu inele ondulate din aluminiu; însă pot fi utilizate cu succes flacoane cu un volum cuprins între 0,1 și 1 litru;

([1]) Dimensiunea recomandată este cuprinsă între 0,1 litri și 1 litru.

([2]) Se recomandă utilizarea de septuri din silicon impermeabile la gaze. Se recomandă, de asemenea, testarea impermeabilității la gaze a dopurilor, în special septurile din butil-cauciuc, deoarece numeroase septuri disponibile pe piață nu sunt suficient de etanșe la metan, iar anumite septuri nu rămân etanșe atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile testului.
- Se recomandă septurile impermeabile la gaze și trebuie utilizate pentru substanțe chimice volatile (anumite septuri disponibile pe piață sunt destul de subțiri, având mai puțin de 0,5 cm și nu rămân etanșe la gaze după străpungerea lor cu un ac de seringă);
- Sunt recomandate septurile din butil-cauciuc (aproximativ 1 cm), în cazul în care substanțele de testare nu sunt volatile (acestea rămân în mod normal etanșe la gaze după străpungere.)
- Înainte de începerea testului, se recomandă examinarea cu atenție a capacității septurilor de a rămâne etanșe la gaze după străpungere.

▼M6

c) Manometru de precizie [1] și ace fixate

Producția totală de gaze (metan și dioxid de carbon) măsurată cu ajutorul unui manometru adaptat pentru a permite măsurarea și evacuarea gazelor produse. Un exemplu de instrument adecvat este un manometru de precizie manual conectat la un ac de seringă; o supapă etanșă la gaze cu trei căi permite eliberarea presiunii în exces (anexa 1). Este necesară menținerea volumului intern în tubulatura și supapa transductorului de presiune la un nivel cât mai scăzut posibil, astfel încât erorile introduse prin neluarea în considerare a volumului echipamentului să fie nesemnificativă;

d) Recipiente etanșe pentru transportul nămolului de digestie;

e) Supape de presiune cu trei căi;

f) Sită, cu ochiuri de 1 mm pătrat;

g) Rezervor pentru nămolul de digestie, un flacon din sticlă sau din polietilenă de înaltă densitate, cu o capacitate de 5 litri, prevăzut cu un agitator și un dispozitiv care permite trecerea unui curent de azot gazos (a se vedea punctul 13) prin spațiul superior:

h) filtre membranare (0,2 μm) pentru sterilizarea substratului;

i) microseringi, pentru conexiunea etanșă la gaze a transductorului de presiune [a se vedea punctul 12 litera (c)] cu spațiul superior din flacoane [a se vedea punctul 12 litera (b)]; de asemenea, pentru adăugarea de materiale de testare lichide insolubile în flacoane;

j) boxă cu mănuși, opțională, dar recomandată, cu o presiune de azot ușor pozitivă.

Reactivi

13. Se utilizează întotdeauna reactivi cu puritate analitică. Trebuie utilizat întotdeauna azot gazos de înaltă puritate cu un conținut de oxigen mai mic de 5μl/l.

Apă

14. În cazul în care diluarea este necesară în orice etapă, se utilizează apă deionizată dezaerată în prealabil. Nu sunt necesare controale analitice ale acestei ape, însă trebuie asigurată întreținerea regulată a aparaturii de deionizare. Trebuie utilizată apă deionizată și pentru pregătirea soluțiilor stoc. Înainte de adăugarea inoculului la orice soluție sau soluție de diluare a materialului de testare, trebuie să se verifice ca soluția respectivă să nu conțină oxigen. Acest lucru se realizează prin suflarea de azot gazos în apa de diluție (sau în diluanți) timp de 1 oră înainte de adăugarea inoculului sau, alternativ, prin încălzirea apei de diluție până la punctul de fierbere și răcirea acesteia la temperatura camerei într-o atmosferă fără oxigen.

Nămolul digerat

15. Nămolul de digestie activ este prelevat într-un fierbător al unei stații de tratare a apelor uzate sau, alternativ, într-un fierbător de laborator, care tratează nămol provenit în cea mai mare parte din apele uzate menajere. Informații practice privind nămolul dintr-un fierbător de laborator sunt disponibile în alte referințe (11). În cazul în care este prevăzută utilizarea unui inocul adaptat, poate fi luată în considerare prelevarea de nămol de digestie provenit de la o stație de tratare a efluenților industriali. Pentru

[1] Manometrul trebuie utilizat și calibrat la intervale regulate, conform instrucțiunilor producătorului. În cazul în care este utilizat un manometru având calitatea necesară, de exemplu capsulat cu o membrană din oțel, nu este necesară nicio calibrare în laborator. Acesta trebuie calibrat de un institut autorizat la intervalele recomandate. Exactitatea calibrării poate fi verificată în laborator cu o măsurătoare într-un singur punct la 1×10^5 Pa pe un manometru cu afișare mecanică. Atunci când acest punct este măsurat corect, liniaritatea va fi, de asemenea, nealterată. În cazul utilizării altor dispozitive de măsurare (fără calibrare certificată de către producător), se recomandă conversia pe intervalul total la intervale regulate (apendicele 2).

▼M6

colectarea nămolului, a se utiliza flacoane cu gura largă din polietilenă de înaltă densitate sau dintr-un material similar, care se pot dilata. Se introduce nămol în flacoanele de probe până la aproximativ 1 cm distanță de gura acestora, se închid ermetic, de preferat cu o supapă de siguranță [punctul 12 litera (e)] și se așează în recipiente etanșe [punctul 12 litera (d)] pentru a reduce la minimum șocul termic, până la transferul acestora într-un incubator menținut la o temperatură de 35 °C ± 2 °C. La deschiderea flacoanelor, se eliberează presiunea de gaze în exces prin desfacerea cu atenție a capacului sau cu ajutorul unei supape de presiune cu trei căi [punctul 12 litera (e)]. Se recomandă utilizarea nămolului într-un interval de câteva ore de la prelevare sau depozitarea acestuia la o temperatură de 35 °C ± 2 °C sub un spațiu superior umplut cu azot timp de maximum 3 zile, când survine în mod obișnuit o oarecare pierdere de activitate.

Avertisment – Nămolul de digestie produce gaze inflamabile care prezintă risc de incendiu și de explozie: acesta conține și organisme potențial patogene, de aceea, trebuie luate măsuri de precauție corespunzătoare în momentul manipulării acestuia. Din motive de siguranță, a se evita utilizarea de vase din sticlă pentru colectarea nămolului.

Inocul

16. Imediat înainte de utilizare, se amestecă nămolul prin agitare ușoară și se strecoară cu o strecurătoare cu ochiuri de 1 mm^2 [a se vedea punctul 12 litera (f)] înainte de a se introduce într-un flacon corespunzător [punctul 12 litera (g)] al cărui spațiu superior este traversat de un curent de azot. Se prelevează o probă pentru măsurarea concentrației materiilor solide uscate totale [a se vedea, de exemplu, ISO 11 923 (13) sau un standard UE echivalent]. A se utiliza în general nămol fără diluție. Concentrația solidelor este de obicei cuprinsă între 2 % și 4 % (g/v). Trebuie verificată valoarea pH-ului nămolului și, dacă este necesar, ajustată la 7 ± 0,5.

Substratul de testare

17. Se dizolvă 10 g de bulion nutritiv (de exemplu oxid), 10 g de extract de drojdie și 10 g de D-glucoză în apa deionizată și se diluează la 100 ml. Se sterilizează prin filtrare cu un filtru membranar de 0,2 μm [punctul 12 litera (h)] și se utilizează imediat sau se depozitează la o temperatură de 4 °C maximum 1 zi.

Substanța chimică de testare

18. Se pregătește o soluție stoc separată pentru fiecare substanță chimică de testare solubilă în apă astfel încât să conțină, de exemplu, 10 g/l din substanța chimică în apa de diluție fără oxigen (punctul 14). Se utilizează volume corespunzătoare din aceste soluții stoc pentru a pregăti amestecurile de reacție cu concentrații crescătoare. Alternativ, se pregătește o serie de soluții de diluare din fiecare soluție stoc astfel încât volumul adăugat la flacoanele de testare să fie identic cu cel pentru fiecare concentrație finală necesară. Dacă este necesar, pH-ul soluțiilor stoc trebuie ajustat la 7 ± 0,2.

19. Pentru substanțele chimice care nu sunt suficient de solubile în apă, a se consulta standardul ISO 10 634 (12) sau un standard UE echivalent. În cazul în care trebuie utilizat un solvent organic, a se evita solvenți precum cloroformul și tetraclorura de carbon cunoscute ca fiind inhibitoare puternice ale producției de metan. Se prepară o soluție cu o concentrație corespunzătoare de substanță chimică insolubilă în apă într-un solvent volatil adecvat, de exemplu, acetonă, eter dietilic. Se adaugă volumele necesare de soluție de solvent în flacoanele de testare goale [punctul 12 litera (b)] și se evaporă solventul înainte de adăugarea nămolului. Pentru alte tratamente, ase consulta standardul ISO 10 634 (12) sau un standard UE echivalent, însă a se avea în vedere faptul că orice agent tensioactiv utilizat pentru producere de emulsii poate fi inhibitor pentru producția anaerobă de gaze. Dacă se estimează că prezența unor solvenți organici și a unor emulsionanți cauzează artefacte, substanța chimică de testare ar putea fi adăugată direct la amestecul de testare sub formă de pudră sau sub formă lichidă. Substanțele chimice volatile și substanțele chimice de testare lichide insolubile în apă pot fi injectate în flacoane de ser inoculat cu ajutorul unor microseringi [punctul 12 litera (i)].

▼M6

20. Se adaugă substanțele chimice de testare în flacoane pentru a obține o serie geometrică de concentrații, de exemplu, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l și 15,6 mg/l. În cazul în care nu se cunoaște intervalul de toxicitate din soluții chimice similare, se efectuează mai întâi un test preliminar de stabilire a intervalului la concentrațiile de 1 000 mg/l, 100 mg/l și 10 mg/l pentru determinarea intervalului corespunzător.

Substanța chimică de referință

21. Se prepară o soluție apoasă de 3,5-diclorfenol (10 g/l) adăugând treptat cantitatea minimă de 5 mol/l de soluție de hidroxid de sodiu la materia solidă, agitând în același timp până la dizolvare. Se adaugă apoi apă de diluție deoxigenată (punctul 14) la volumul necesar; sonicarea poate favoriza diluarea. Pot fi utilizate și alte substanțe chimice de referință atunci când intervalul mediu al EC_{50} a fost obținut în cadrul a cel puțin trei teste cu inoculi diferiți (surse diferite sau momente diferite de colectare).

INTERFERENȚĂ/ERORI

22. Se pare că anumiți constituenți ai nămolului ar putea reacționa cu potențiali inhibitori anulându-le efectele asupra microorganismelor determinând o inhibare mai redusă sau nulă. De asemenea, dacă nămolul conține deja o substanță chimică inhibitoare, ar putea fi obținute rezultate eronate atunci când substanța chimică respectivă este supusă testării. În afară de aceste posibilități, există o serie de factori identificați care pot conduce la rezultate false. Aceștia sunt enumerați în apendicele 3 împreună cu metodele pentru eliminarea sau cel puțin pentru reducerea erorilor.

PROCEDURA DE TESTARE

23. Numărul probelor duplicat necesare depinde de gradul de precizie necesar pentru indicii de inhibare. În cazul în care capacele flacoanelor sunt suficient de etanșe la gaze pe întreaga durată a testului, se pregătește un singur lot (cel puțin trei probe duplicat) de flacoane de testare la fiecare concentrație necesară. Similar, se pregătește un lot de flacoane cu substanța chimică de referință și un set de probe de control. Cu toate acestea, în cazul în care fiabilitatea capacelor flacoanelor este asigurată doar pentru o străpungere sau pentru câteva străpungeri, se pregătește un lot (de exemplu, trei probe duplicat) de flacoane de testare pentru fiecare interval (t) pentru care sunt necesare rezultate la toate concentrațiile unei substanțe chimice de testare care trebuie testate. Similar, se pregătesc loturi „t” de flacoane pentru substanța chimică de referință și pentru probele de control.

24. Se recomandă utilizarea unei boxe cu mănuși [punctul 12 litera (j)]. Cu cel puțin 30 de minute înainte de începerea testului, se lasă să treacă un flux de azot gazos prin boxa cu mănuși care conține toate echipamentele necesare. Temperatura nămolului trebuie să fie de 35 °C ± 2 °C pe parcursul manipulării și ermetizării flacoanelor.

Test preliminar

25. În cazul în care nu se cunoaște activitatea nămolului, se recomandă efectuarea unui test preliminar. Se pregătesc probe de control pentru a obține, de exemplu, concentrații ale materiilor solide de 10 g/l, 20 g/l și 40 g/l la care se adaugă substratul, însă nu se utilizează nicio substanță chimică de testare. De asemenea, se utilizează volume diferite de amestec de reacție pentru a obține trei sau patru raporturi între volumul de spațiu superior și volumul de lichid. Dintre rezultatele de volume de gaze produse la diferite intervale de timp, se aleg condițiile cele mai adecvate care permit două măsurători zilnice caracterizate de volume semnificative de gaze și care eliberează o presiune zilnică cu o sensibilitate [1] optimă fără risc de explozii.

Adăugarea substanțelor chimice de testare

26. În flacoanele de testare goale se adaugă substanțe chimice de testare solubile în apă [punctul 12 litera (b)] sub formă de soluții apoase (punctul 18). Se

[1] Aceasta se aplică modelului experimental și condițiilor experimentale în care volumele de gaze produse – din probele-martor și din vase care indică o inhibare de 70 – 80 % – pot fi estimate cu marje de eroare acceptabile.

▼M6

utilizează seturi de flacoane care conțin cel puțin trei probe duplicat pentru fiecare concentrație dintr-un interval (punctul 20). În cazul unor substanțe chimice de testare insolubile sau puțin solubile, se injectează soluții din acestea în solvenți organici cu ajutorul unei microseringi în flacoanele goale pentru a obține seturi de probe duplicat cu cinci concentrații de substanță chimică de testare. Se evaporă solventul prin purjare cu un jet de azot gazos pe suprafața soluțiilor din flacoanele de testare. Alternativ, se adaugă direct în flacoanele de testare cantități cântărite de substanțe chimice solide insolubile.

27. Dacă substanțele chimice de testare lichide insolubile sau puțin solubile în apă nu se adaugă utilizând un solvent, acestea se adaugă direct cu ajutorul unei microseringi în flacoanele de testare după adăugarea inoculului și a substratului de testare (a se vedea punctul 30). Substanțele chimice de testare volatile pot fi adăugate în același mod.

Adăugarea inoculului și a substratului

28. Se agită un volum corespunzător de nămol de digestie strecurat (a se vedea punctul 16) într-un flacon de 5 litri [punctul 12 litera (g)], lăsând în același timp să treacă prin spațiul superior un curent de azot gazos. Flacoanele de testare, care conțin soluțiile apoase sau soluțiile dintr-un solvent evaporat de substanțe chimice de testare, sunt purjate cu un curent de azot gazos timp de aproximativ două minute pentru a elimina aerul. Se repartizează în flacoanele de testare alicote, de exemplu 100 ml, de nămol amestecat bine utilizând o pipetă cu vârf larg sau o eprubetă gradată. Este esențial ca pipeta să fie umplută dintr-o singură încercare cu volumul exact de nămol deoarece materiile solide din nămol se sedimentează cu ușurință. În cazul în care se prelevează prea mult, pipeta se golește și se repetă operațiunea.

29. Se adaugă apoi o cantitate suficientă de soluție de substrat (punctul 17) pentru a obține în amestec o concentrație de 2 g/l din fiecare dintre componentele bulionului nutritiv, și anume extractul de drojdie și D-glucoza, continuând în aceleași timp purjarea cu azot. În continuare este prezentat un exemplu de loturi de testare.

Concentrația masică finală a substanței chimice de testare din flacoanele de testare (mg/l)	Volumul substanței chimice de testare (ml)		Reactivi și medii (ml)		
	Soluție stoc a) 10 g/l punctul 18	Soluție stoc b) 1 g/l punctul 18	Apa de diluție punctul 14	Inocul punctul 16	Substrat punctul 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volumul total al flaconului = 160 ml. Volumul de lichid = 103 ml
Volumul de gaz = 57 ml sau 35,6 % din volumul total.

30. În mod similar, se purjează cu azot gazos un număr suficient de flacoane de testare goale pentru a elimina orice substanță chimică de testare volatilă și lichidă insolubilă (a se vedea punctul 27).

▼M6

Probele de control și substanța chimică de referință

31. Se prepară seturi de flacoane conținând cel puțin trei probe duplicat, incluzând doar nămolul și substratul, pentru a fi utilizate ca probe de control. Se prepară apoi flacoane duplicat care conțin nămolul și substratul, precum și o cantitate suficientă de soluție stoc a substanței chimice de referință, 3,5-diclorfenol (punctul 21) pentru a obține o concentrație finală de 150 mg/l. Această concentrație trebuie să inhibe producția de gaze cu aproximativ 50 %. Alternativ, se prepară un interval de concentrații pentru substanța chimică de referință. În plus, se pregătesc patru flacoane suplimentare pentru măsurarea pH-ului care conțin nămol, apă deoxigenată și substrat. Se adaugă substanța de testare în două flacoane cu cea mai mare concentrație de testare, iar apa deoxigenată se adaugă în cele două flacoane rămase.

32. Toate flacoanele – substanțele chimice de testare și de referință și probele de control – trebuie să conțină același volum (V_R) de lichid; dacă este necesar, se adaugă apă deionizată deoxigenată (punctul 14) pentru a ajusta volumul. Spațiul superior trebuie să fie între 10 % și 40 % din volumul flacoanelor, valoarea efectivă fiind selectată din datele obținute în urma testului preliminar. După adăugarea tuturor constituenților în flacoane, se îndepărtează acul de alimentare cu gaz și se etanșeizează fiecare flacon cu un dop din cauciuc și cu o capsulă din aluminiu [punctul 12 litera (b)] umezind dopul cu o picătură de apă deionizată pentru a facilita introducerea sa. Se amestecă conținutul fiecărui flacon prin agitare.

Incubarea flacoanelor

33. Flacoanele sunt transferate în incubatorul controlat termostatic, de preferință echipat cu un dispozitiv de agitare, și ținute la o temperatură de 35 °C ± 2 °C. Flacoanele sunt incubate la întuneric. După aproximativ 1 oră, se echilibrează presiunea în flacoane la presiunea atmosferică prin introducerea acului seringii, atașat la manometru [punctul 12 litera (c)], în capacul fiecărui flacon, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și, în final, se închide supapa. Acul trebuie introdus la un unghi de 45° pentru a împiedica scurgerile de gaze din flacoane. Dacă flacoanele sunt incubate fără un dispozitiv de agitare, acestea trebuie agitate manual de două ori pe zi pe parcursul întregii perioade de incubare pentru a echilibra sistemul. Flacoanele trebuie incubate în poziție răsturnată pentru a împiedica orice pierdere de gaze prin sept. Cu toate acestea, răsturnarea nu este recomandată în cazurile în care substanțele chimice de testare insolubile se pot lipi de fundul flaconului.

Măsurarea presiunii

34. Atunci când flacoanele au atins temperatura de 35 °C ± 2 °C, se măsoară și se înregistrează pH-ul conținutului a patru flacoane pregătite în acest scop și se elimină conținutul; se continuă incubarea la întuneric a restului de flacoane. Se măsoară și se înregistrează presiunea din flacoane de două ori pe zi timp de 48-72 de ore prin introducerea acului manometrului, pe rând, în capacul fiecărui flacon, uscând acul după fiecare măsurătoare. Toate părțile flaconului trebuie menținute la temperatura de incubare pe parcursul măsurătorii care trebuie efectuată cât mai repede posibil. Presiunea se înregistrează după stabilizarea afișajului acesteia. Apoi se deschide supapa pentru ventilație și se închide atunci când presiunea atinge valoarea zero. Testul durează de obicei 48 de ore din momentul primei echilibrări a presiunii, indicate prin „timpul 0”. Numărul măsurătorilor și a ventilărilor trebuie limitat în cazul substanțelor chimice volatile la unu (la încheierea perioadei de incubare) sau la doi pentru a reduce la minimum pierderile de substanță chimică de testare (10).

35. Dacă rezultatul măsurătorii presiunii este negativ, nu deschideți supapa. Uneori se acumulează umezeală în acul și tubul seringii, fenomen indicat printr-o valoare ușor negativă a presiunii. În acest caz, se îndepărtează acul, se agită tubul, se șterge cu un șervețel și se introduce un ac nou.

Măsurarea pH-ului

36. pH-ul conținutului fiecărui flacon se măsoară și se înregistrează după măsurarea presiunii finale.

▼M6

DATE ȘI RAPORT

Exprimarea rezultatelor

37. Se calculează suma și media presiunilor înregistrate la fiecare interval de timp pentru fiecare set de flacoane duplicat și se calculează media presiunilor brute cumulate de gaze la fiecare interval de timp pentru fiecare set de flacoane duplicat. Se trasează curbele producției medii cumulate de gaze (Pa) în funcție de timp pentru flacoanele de control, de testare și de referință. Se selectează un timp pe partea liniară a curbei, în general 48 de ore, și se calculează procentajul de inhibare (I) pentru fiecare concentrație cu ecuația [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

unde

I = procentajul de inhibiție, în %;

P_t = presiunea gazului produsă cu materialul de testare la timpul selectat, în Pascal (Pa);

P_c = presiunea gazului produsă în proba de control la același timp, în Pascal (Pa).

Se recomandă trasarea a două curbe, și anume curba I în funcție de concentrație și, de asemenea, în funcție de logaritmul concentrației astfel încât să poată fi selectată curba care este cea mai apropiată de liniaritate. Se evaluează vizual sau prin analiză de regresie valoarea EC_{50} (mg/l) pornind de la curba cea mai apropiată de liniaritate. În scopul comparării, ar putea fi mai utilă exprimarea concentrației substanței chimice în mg de substanță chimică/g din totalul materiilor solide uscate. Pentru a obține această concentrație, se împarte concentrația volumetrică (mg/l) la concentrația volumetrică a materiilor solide din nămolul uscat (g/l) (punctul 16).

38. Se calculează procentajul de inhibare obținut prin unica concentrație a substanței chimice de referință utilizată sau valoarea EC_{50} în cazul în care a fost examinat un număr suficient de concentrații.

39. Se realizează conversia presiunii medii a gazelor produse în flaconul de control P_c (Pa) în volum pe baza curbei de calibrare a manometrului (apendicele 2) și se calculează astfel randamentul de gaze, exprimat în volumul produs în 48 de ore din 100 ml de nămol nediluat la o concentrație a materiilor solide cuprinsă între 2 % (20 g/l) și 4 % (40 g/l).

Criterii de validitate

40. Rezultatele obținute în urma testului interlaboratoare ISO (5) au indicat că substanța chimică de referință (3,5-diclorfenol) a cauzat o inhibare de 50 % a producției de gaze într-un interval al concentrațiilor cuprins între 32 mg/l și 510 mg/l, cu o medie de 153 mg/l (punctul 10). Acest interval este atât de larg încât nu pot fi stabilite cu încredere limite exacte pentru inhibiție utilizabile drept criterii de validitate; acest lucru ar trebui să fie posibil atunci când tehnicile vor indica un mod de producere de inocul mai consistent. Volumele de gaze produse în flacoanele de control în 48 de ore s-au încadrat între 21 ml/g de materie uscată de nămol și 149 ml/g (cu o medie de 72 ml/g). Nu a existat un raport clar între volumul de gaze produs și valoarea EC_{50} corespunzătoare. pH-ul final a variat între 6,1 și 7,5.

41. Testul este considerat valid atunci când este obținută o inhibare mai mare de 20 % în proba de control de referință care conține 150 mg/l de 3,5-diclorfenol, atunci când se produce mai mult de 50 ml de gaz per g de materie uscată în proba-martor și valoarea pH-ului se încadrează în intervalul 6,2-7,5 la finalul testului.

Raportul de testare

42. Raportul de testare trebuie să includă următoarele informații:

Substanța chimică testată

— denumirea comună, denumirea chimică, numărul CAS, formula structurală și proprietățile fizico-chimice relevante;

▼M6

— puritatea (impuritățile) substanței chimice testate.

Condițiile de testare

— volumul conținutului de lichid și volumul spațiului superior din vasele de testare;

— descrierea vaselor de testare și a aparatului de măsurare a gazelor (de exemplu, tipul de manometru);

— aplicarea substanței chimice de testare și a substanței chimice de referință la sistemul de testare, concentrațiile de testare utilizate și utilizarea de solvenți;

— detalii privind inoculul utilizat: numele stației de tratare a apelor uzate, descrierea sursei apelor uzate tratate (de exemplu, temperatura de funcționare, timpul de retenție al nămolului, provenit în cea mai mare parte din apele uzate menajere sau deșeuri industriale etc.), concentrația materiilor solide, activitatea de producere de gaze a fierbătorului anaerob, expunerea prealabilă sau posibila preadaptare la substanțele chimice toxice sau locul prelevării mâlului, sedimentului etc.;

— temperatura și intervalul de incubare;

— numărul de flacoane duplicat.

Rezultate

— valoarea pH-ului la finalul testului;

— toate datele măsurate colectate din vasele de testare, probele-martor și vasele de control cu substanțele chimice de referință, după caz (de exemplu, presiunea în Pa sau milibari) sub formă de tabel;

— procentul de inhibare din flacoanele de testare și de referință și curbele de inhibare în funcție de concentrație;

— calcularea valorilor EC_{50}, exprimate în mg/l și mg/g;

— producția de gaze per g de nămol în 48 de ore;

— motivele unei eventuale respingeri a rezultatelor testului;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice abatere de la procedurile din cadrul prezentei metode de testare și discutarea tuturor abaterilor observate în rezultatele testului cauzate de interferențe și de erori în raport cu rezultatele estimate;

— abordarea, de asemenea, a aspectelor legate de definirea scopului testului, și anume măsurarea toxicității pentru microorganisme expuse sau nu în prealabil.

BIBLIOGRAFIE

(1) Capitolul C.11 din prezenta anexă: Nămol activ, test de inhibare a respirației.

(2) Capitolul C.43 din prezenta anexă: Biodegradabilitatea anaerobă a substanțelor organice din nămolul digerat: metoda prin măsurarea producerii de gaze.

(3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼M6

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Res. Control Fed. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential., Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS şi Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA şi Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Ind. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T şi Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

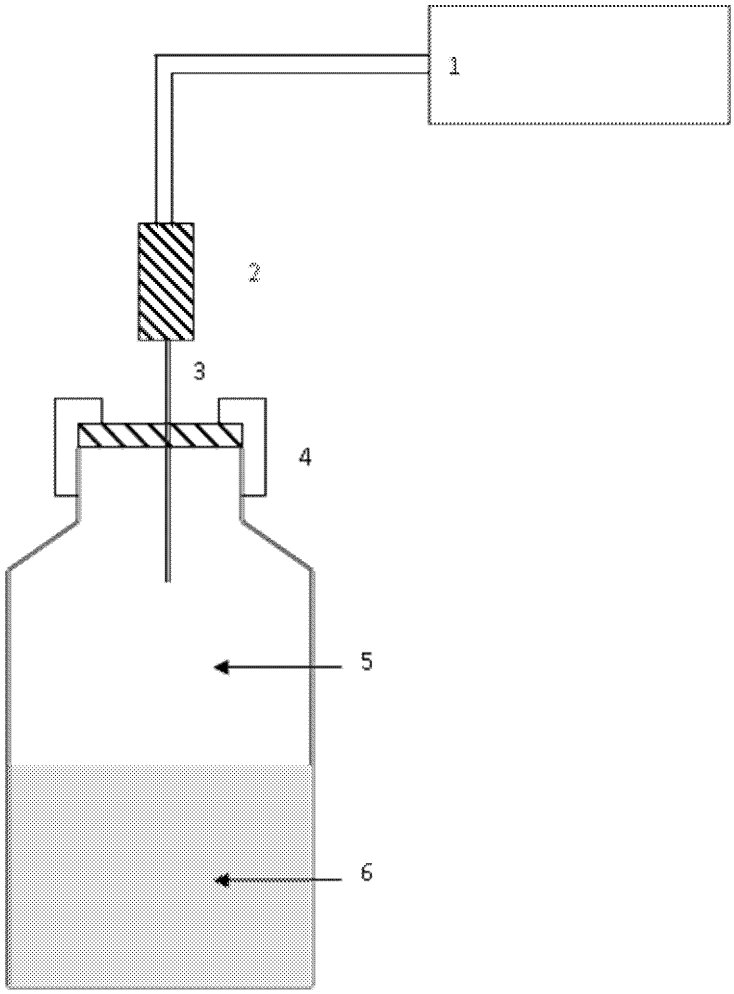
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Apendicele 1

Exemplu de aparat pentru măsurarea producției de biogaz prin presiunea gazului



Legendă:

1 – Manometru

2 – Supapă etanșă la gaze cu trei căi

3 – Ac de seringă

4 – Capac etanș la gaze (capsulă și sept ondulate)

5 – Spațiu superior

6 – Inocul de nămol digerat

Vase de testare dintr-un mediu cu o temperatură de 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Apendicele 2

Conversia măsurătorilor manometrice

Valorile indicate de manometru pot fi raportate la volumele de gaze cu ajutorul unei curbe standard de referință și pornind de la aceasta se poate calcula volumul de gaz produs per g de nămol uscat per 48 de ore. Acest index de activitate este utilizat ca unul dintre criteriile de evaluare a validității rezultatelor testului. Curba de calibrare se obține prin injectarea volumelor de gaz cunoscute la o temperatură de 35 °C ± 2 °C în flacoanele de ser care conțin un volum de apă egal cu cel al amestecului de reacție, V_R;

— Se introduc alicote de V_R ml de apă, menținute la o temperatură de 35 °C ± 2 °C în cinci flacoane de ser. Se etanșează flacoanele și se așează într-o baie de apă la o temperatură de 35 °C ± 2 °C timp de 1 oră pentru echilibrare;

— Se pornește manometrul, se lasă să se stabilizeze și se reglează la zero;

— Se introduce acul seringii prin capacul unuia dintre flacoane, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și se închide supapa;

— Se repetă procedura cu restul flacoanelor;

— Se injectează 1 ml de aer la temperatura de 35 °C ± 2 °C în fiecare flacon. Se introduce acul (pe manometru) prin capacul unuia dintre flacoane și se așteaptă stabilizarea presiunii. Se înregistrează presiunea, se deschide supapa până ce presiunea atinge valoarea zero și apoi se închide supapa;

— Se repetă procedura cu restul flacoanelor;

— Se repetă întreaga procedură utilizând 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml și 50 ml de aer;

— Se trasează o curbă de conversie a presiunii (Pa) în funcție de volumul de gaz injectat (ml). Răspunsul instrumentului este linear în intervalul 0 Pa-70 000 Pa și 0 ml-50 ml de producție de gaze.

▼M6

Apendicele 3

Factori identificați care pot conduce la rezultate false

(a) *Calitatea dopurilor flacoanelor*

Sunt disponibile pe piață diferite tipuri de septuri pentru flacoanele de ser; multe dintre acestea, inclusiv butil-cauciucul, pierd din etanșeitate atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile acestui test. Uneori presiunea scade foarte ușor după străpungerea septului cu acul seringii. Se recomandă utilizarea unor septuri etanșe la gaze pentru a preveni scurgerile [punctul 12 litera (b)].

(b) *Umiditatea din acul seringii*

Uneori se acumulează umezeală în acul și tubul seringii, fenomen indicat printr-o valoare ușor negativă a presiunii. Pentru a corecta acest fenomen, se îndepărtează acul, se agită tubul, se șterge cu un șervețel și se introduce un ac nou [punctele 12 litera (c) și 35].

(c) *Contaminarea cu oxigen*

Metodele anaerobe sunt sensibile la erori determinate de contaminarea cu oxigen care poate cauza reducerea producției de gaze. În cadrul prezentei metode, această posibilitate ar trebui redusă la minimum prin utilizarea de tehnici strict anaerobe, inclusiv utilizarea unei boxe cu mănuși.

(d) *Substraturile brute din nămol*

Producția anaerobă de gaze și sensibilitatea nămolului sunt influențate de substraturile care sunt transferate cu inoculul în flacoanele de testare. Nămolul digerat din fierbătoare anaerobe menajere conține adesea materii identificabile ca păr și reziduuri vegetale de celuloză, care tind să îngreuneze prelevarea de probe reprezentative. Prin strecurare, materiile insolubile grosiere de nămol pot fi eliminate pentru a spori reprezentativitatea prelevării de probe (punctul 16).

(e) *Substanțele chimice de testare volatile*

Substanțele de testare volatile vor fi eliberate în spațiul superior al flacoanelor de testare. Acest lucru poate avea ca rezultat pierderea din sistem a unei părți din materialele de testare pe parcursul ventilării după efectuarea măsurătorilor presiunii, ceea ce se traduce prin valori ale EC_{50} fals ridicate. Acest tip de erori poate fi redus prin alegerea corectă a unui raport între volumul de spațiu superior și volumul de lichid și prin eliminarea ventilării după efectuarea măsurătorilor presiunii (10).

(f) *Neliniaritatea producției de gaze*

În cazul în care curba de producție medie cumulată de gaze în raport cu timpul de incubare nu este aproape liniară pentru o perioadă de 48 de ore, exactitatea testului poate fi diminuată. Pentru soluționarea acestei probleme, se recomandă utilizarea de nămol de digerare dintr-o sursă diferită și/sau adăugarea unei concentrații crescute de substrat de testare și bulion nutritiv, extract de drojdie și glucoză (punctul 29).

▼M6

Apendicele 4

Aplicare pe probe prelevate din mediu cu concentrație de biomasă redusă – mâl, sedimente etc.

INTRODUCERE

A.1 În general, activitatea microbiană specifică (volumul de gaze produs per g de materii solide uscate) a mâlurilor, sedimentelor, solurilor etc. anaerobe naturale este mult mai redusă decât cea a nămolului anaerob derivat din apele uzate. În consecință, atunci când urmează să fie măsurate efectele inhibitorii ale substanțelor chimice asupra acestor probe mai puțin active, trebuie modificate unele dintre condițiile experimentale. Pentru aceste probe mai puțin active, există două căi generale de acțiune posibile:

(a) Efectuarea unui test preliminar modificat (punctul 25) cu proba de nămol, de sol etc. nediluat la o temperatură de 35 °C ± 2 °C sau la temperatura din locul de prelevare a probei, pentru optimizarea simulării (conform părții 1 din ISO 13 641);

(b) Sau efectuarea testului cu un nămol diluat provenit de la un fierbător (1 în 100) pentru a simula activitatea redusă prevăzută a probei prelevate din mediu, însă menținând temperatura la 35 °C ± 2 °C (conform părții 2 din ISO 13 641).

A.2 Opțiunea (a) se poate realiza urmând metoda descrisă în prezenta anexă (echivalentă cu partea 1 din ISO 13 641), însă este esențială efectuarea unui test preliminar (punctul 25) pentru determinarea condițiilor optime, cu excepția cazului în care acestea sunt deja cunoscute din teste anterioare. Proba de mâl sau de sediment trebuie să fie bine amestecată, de exemplu, într-un blender și, dacă este necesar, diluată cu o proporție mică de apă de diluție dezaerată (punctul 14) astfel încât să fie suficient de mobilă pentru a fi transferată cu o pipetă cu vârful larg sau cu o eprubetă gradată. Dacă se consideră că lipsesc nutrienți, proba de mâl poate fi centrifugată (în condiții anaerobe) și repusă în suspensie în mediul mineral care conține extract de drojdie (A.11).

A.3 Opțiunea (b). Aceasta reproduce în mod rezonabil activitatea redusă a probelor prelevate din mediu, cu excepția concentrației ridicate de materii solide în suspensie prezentă în aceste probe. Nu se cunoaște rolul acestor materii solide în inhibare, însă este posibil ca reacția dintre substanțele chimice de testare și constituenții mâlului, precum și adsorbția substanțelor chimice de testare în materiile solide să aibă ca rezultat o scădere a toxicității substanței chimice de testare.

A.4 Temperatura este un alt factor important: pentru o simulare riguroasă, testele trebuie efectuate la temperatura din locul prelevării probelor, întrucât se știe că diferite grupuri metanogene de bacterii sunt funcționale în intervale de temperatură diferite, și anume termofilele (~ 30-35 °C), mezofilele (20-25 °C) și psihrofilele (< 20 °C), care pot prezenta modele de inhibare diferite.

A.5 Durata. În cadrul testului general, partea 1, în care s-a utilizat nămol nediluat, producția de gaze în cele 2-4 zile a fost întotdeauna suficientă, în timp ce în partea 2, cu nămol diluat de 100 de ori, producția de gaze, în cazul în care a existat, a fost insuficientă pe parcursul acestei perioade în cadrul ring testului. Madsen et al (1996), în descrierea lor a acestui din urmă test, propun o perioadă de 7 zile.

Testare cu o concentrație redusă de biomasă (opțiunea b)

Trebuie efectuate următoarele modificări și completări, prin adăugarea sau înlocuirea anumitor puncte și subpuncte din textul principal.

▼**M6**

A.6 La punctul 6 se adaugă textul următor: Principiul testului;

„Prezenta tehnică poate fi utilizată cu nămol anaerob diluat 1 la 100, parțial pentru a simula activitatea redusă a mâlului și a sedimentelor. Temperatura de incubare poate fi de 35 °C sau egală cu cea din locul în care a fost prelevată proba. Întrucât activitatea bacteriană este mult mai redusă decât în nămolul nediluat, perioada de incubare trebuie prelungită la cel puțin 7 zile”.

A.7 La punctul 12 litera (a) se adaugă textul următor:

„incubatorul trebuie să aibă capacitatea de a funcționa la temperaturi mai mici de 15 °C.”

A.8 Se adaugă un reactiv suplimentar după punctul 13:

„Acid fosforic (H_3PO_4), 85 % procente masice în apă.”

A.9 La finalul punctului 16 se adaugă următorul text:

„Se utilizează în cadrul testului o concentrație finală de 0,20 ± 0,05 g/l din materiile solide uscate.”

A.10 Punctul 17. Substratul de testare

Acest substrat nu este utilizat, însă este înlocuit cu extract de drojdie (a se vedea punctul 17; punctele A.11, A.12, A.13).

A.11 Este necesar un mediu mineral, incluzând oligoelemente, pentru diluarea nămolului anaerob și se recomandă adăugarea la acest mediu a substratului organic, extractul de drojdie.

După alineatul (17), se adaugă

„(a) Mediu mineral de testare, cu extract de drojdie.

Acesta se prepară dintr-un mediu de testare concentrat de 10 ori [punctul 17 litera (b), A.12] cu o soluție cu oligoelemente [punctul 17 litera (c), A.13]. Se utilizează sulfură de sodiu nonahidrat proaspătă [punctul 17 litera (b)]; A.12] sau se spală și se usucă înainte de utilizare pentru a se asigura că are o capacitate reducătoare suficientă. În cazul în care testul este efectuat fără a se utiliza o boxă cu mănuși [punctul 12 litera (j)], concentrația sulfurii de sodiu în soluția stoc trebuie să fie crescută la 2 g/l (de la 1 g/l). Sulfura de sodiu poate fi adăugată și dintr-o soluție stoc corespunzătoare prin septul flacoanelor de testare închise, întrucât această procedură va reduce riscul de oxidare, până la obținerea unei concentrații finale de 0,2 g/l. Alternativ, poate fi utilizat citrat de titan (III) [punctul 17 litera (b)]. Acesta se adaugă prin septul flacoanelor de testare închise pentru a obține o concentrație cuprinsă între 0,8 mmol/l și 1,0 mmol/l. Citratul de titan (III) este un agent reducător foarte eficient și cu toxicitate redusă, care se prepară după cum urmează: se dizolvă 2,94 g de citrat trisodic dihidrat în 50 ml de apă de diluție fără oxigen (punctul 14) (rezultând o soluție de 200 mmol/l] și se adaugă 5 ml de soluție de clorură de titan (III) (15g/100 ml de apă de diluție). Se neutralizează la un pH de 7± 0,5 cu carbonat de sodiu și se distribuie într-un flacon de ser corespunzător sub un curent de azot gazos. Concentrația de citrat de titan (III) din această soluție stoc este de 164 mmol/l. Utilizați mediul de testare imediat sau depozitați-l la 4 °C timp de maximum 1 zi.

A.12 (b) Mediul de testare concentrat de zece ori, pregătit cu următoarele componente:

dihidrogenofosfat de potasiu anhidru (KH_2PO_4)	2,7 g
hidrogenofosfat disodic (Na_2HPO_4)	4,4 g
(sau 11,2 g dodecahidrat)	5,3 g
clorură de amoniu (NH_4Cl)	

▼**M6**

clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
clorură de magneziu hexahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
clorură de fier (II) tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (indicator redox)	0,01 g
sulfură de sodiu nonahidratat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
[sau citrat de titan (III)] concentrație finală	0,8 mmol/l -1,0 mmol/l
soluție de oligoelemente [punctul 17 litera (c); A.13]	10,0 ml
extract de drojdie	100 g
se dizolvă în apă de diluție (punctul 14) și se ajustează la:	1 000 ml

A.13 (c) Soluția de oligoelemente, preparată cu următoarele componente:

clorură de mangan (II) tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
acid ortoboric (H_3BO_3)	0,05 g
clorură de zinc ($ZnCl_2$)	0,05 g
clorură de cupru (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
molibdat de sodiu dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
clorură de cobalt (II) hexahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
clorură de nichel (II) hexahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
selenit de disodiu (Na_2SeO_3)	0,05 g
se dizolvă în apă de diluție (punctul 14) și se ajustează la:	1 000 ml”

A.14 Punctul 25: Testul preliminar

Este esențial să se efectueze un test preliminar conform descrierii de la punctul 24, exceptând nivelul concentrației de materii solide din nămol care trebuie să fie echivalent cu o sutime din concentrațiile indicate, și anume 0,1g/l, 0,2g/l și 0,4g/l. Durata incubației trebuie să fie de cel puțin 7 zile.*Notă:* În cadrul ring testului (5), volumul de spațiu superior a fost prea mare reprezentând 75 % din volumul total; acesta trebuie să se încadreze în intervalul recomandat de 10 %-40 %. Criteriul relevant este ca volumul de gaze produs pentru o inhibare de aproximativ 80 % să fie măsurabil cu o precizie acceptabilă (de exemplu, între ± 5 % și ± 10 %).

A.15 Punctele 26-30: Adăugarea substanței chimice de testare, a inoculului și a substratului.

Adăugările se realizează în acelaşi mod ca cel descris la prezentele puncte, însă soluția de substraturi (punctul 17) se înlocuiește cu mediul de testare la care se adaugă substratul de extract de drojdie (A.11).

De asemenea, concentrația finală a materiilor solide din nămol este redusă de la 2 g/l – 4 g/l la 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). În tabelul A.1, care înlocuiește tabelul de la punctul 29, sunt furnizate două exemple de adăugare de componente la amestecul de testare.

A.16 Punctul 33: Incubarea flacoanelor

Ca urmare a vitezei scăzute estimate a producției de gaze, incubarea durează cel puțin 7 zile.

▼**M6**

A.17 Punctul 34: Măsurători ale presiunii

Se utilizează aceeași procedură pentru măsurarea presiunii în spațiul superior al flacoanelor, astfel cum se descrie la punctul 34, în cazul în care este necesară analiza cantităților în faza gazoasă. Dacă trebuie măsurate cantitățile totale de CO_2 și CH_4, pH-ul în faza lichidă este redus la aproximativ pH 2 prin injectarea de H_3PO_4 în fiecare flacon relevant și prin măsurarea presiunii după 30 de minute de agitare la temperatura testului. Cu toate acestea, informații suplimentare cu privire la calitatea inoculului pot fi obținute prin măsurarea presiunii în fiecare flacon înainte și după acidificare. De exemplu, dacă viteza de producere de CO_2 este mult mai mare decât cea de producere a metanului, sensibilitatea bacteriilor fermentative poate fi modificată și/sau bacteriile metanogene sunt preferențial afectate de substanța chimică de testare.

A.18 Punctul 36: măsurarea pH-ului

Dacă trebuie utilizat H_3PO_4, trebuie pregătite anumite flacoane suplimentare, în care nu se adaugă H_3PO_4, în special pentru măsurarea pH-ului.

BIBLIOGRAFIE:

Madsen, T, Rasmussen, HB și Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhaga.

Tabelul A.1

Exemple de organizare a testului pentru loturile de testare

Constituenții amestecului de reacție	Exemplul 1	Exemplul 2	Ordinea normală a adăugării
Concentrația inoculului preparat (g/l)	0,42	2,1	—
Volumul inoculului adăugat (ml)	45	9	4
Concentrația inoculului din flacoanele de testare (g/l)	0,20	0,20	—
Volumul mediului de testare adăugat (ml)	9	9	2
Volumul apei de diluție adăugată (ml)	36	72	3
Concentrația extractului de drojdie din flacoanele de testare (g/l)	9,7	9,7	—
Volumul soluției stoc de substanță chimică de testare (ml)	3	3	1
Volumul total de lichid (ml)	93	93	—

▼**M6**

Apendicele 5

Definiții

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„Substanță chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se prezenta metodă de testare.

▼M6

C.35. TEST DE TOXICITATE PE *LUMBRICULUS* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT ÎMBOGĂȚIT

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 225 (2007). Animalele endobentice care ingerează sedimente sunt supuse unui risc potențial ridicat de expunere la substanțele chimice legate de sedimente și, în consecință, trebuie să li se acorde o atenție deosebită, de exemplu, referințele (1), (2), (3). Printre aceste organisme care ingerează sedimente, oligochetele acvatice joacă un rol important în sedimentele sistemelor acvatice. Prin implicarea lor în bioturbația sedimentului și prin funcția lor de pradă, aceste animale pot avea o puternică influență asupra biodisponibilității respectivelor substanțe chimice pentru alte organisme, de exemplu peștii care se hrănesc cu organisme bentice. Spre deosebire de organismele epibentice, oligochetele acvatice endobentice (de exemplu, *Lumbriculus variegatus*) se ascund în sediment și ingerează particule sedimentare de sub suprafața sedimentară. Acest lucru asigură expunerea organismelor de testare la substanța chimică de testare prin toate căile posibile de absorbție (de exemplu, contactul cu particule sedimentare contaminate și ingerarea acestora, dar și prin intermediul apei interstițiale și al apei acoperitoare).

2. Această metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele unei expuneri prelungite a oligochetelor endobentice *Lumbriculus variegatus* (Müller) la substanțele chimice asociate sedimentelor. Aceasta se bazează pe protocoalele existente de testare a toxicității și a bioacumulării din sedimente, de exemplu, referințele (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoda este descrisă pentru condiții statice de testare. Scenariul de expunere utilizat în cadrul acestei metode de testare este îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare. Utilizarea sedimentului îmbogățit este prevăzută pentru simularea unui sediment contaminat cu substanța chimică de testare.

3. De obicei, substanțele chimice care trebuie testate din punctul de vedere al efectului asupra organismelor care trăiesc în sedimente persistă timp îndelungat în acest compartiment. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse prin mai multe căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectele toxice generale depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective și de destinația sa finală în animal. Pentru substanțele chimice puternic absorbante (de exemplu, cu log K_{ow} > 5) sau pentru substanțele chimice cu legături covalente cu sedimentul, ingerarea de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea respectivelor substanțe chimice, hrana necesară pentru reproducerea și creșterea organismelor de testare se adaugă la sediment înainte de aplicarea substanței chimice de testare (11). Metoda de testare descrisă este suficient de detaliată astfel încât testul să poată fi efectuat permițând în același timp adaptări ale modelului experimental în funcție de condițiile din anumite laboratoare și de caracteristicile variate ale substanțelor chimice de testare.

4. Metoda de testare are ca scop determinarea efectelor unei substanțe chimice de testare asupra reproducerii și a biomasei organismelor de testare. Parametrii biologici măsurați sunt numărul total de viermi supraviețuitori și biomasa (greutatea uscată) la finalul expunerii. Aceste date sunt analizate cu ajutorul unui model de regresie pentru a estima concentrația care ar putea cauza un efect de x % (de exemplu, EC_{50}, EC_{25} și EC_{10}) sau cu ajutorul verificării unei ipoteze statistice pentru a determina concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC).

5. Capitolul C. 27 din prezenta anexă „Test de toxicitate pe chironomide cu utilizarea de sediment îmbogățit” (6), furnizează numeroase detalii esențiale și utile pentru aplicarea metodei de testare a toxicității asupra sedimentului. În consecință, acest document servește drept bază pentru efectuarea modificărilor necesare efectuării de teste de toxicitate asupra sedimentelor cu *Lumbriculus variegatus*. Alte documente la care se face referire sunt de exemplu „ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation

▼M6

of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates" (3), „U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates" (7) și „ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates" (12). În plus, experiența practică dobândită pe parcursul ring testului metodei de testare [(13), raportul privind ring testul] și detalii din literatura de specialitate reprezintă surse importante de informații pentru redactarea prezentului document.

CONDIȚII PREALABILE ȘI RECOMANDĂRI

6. Înainte de începerea studiului, trebuie obținute informații cu privire la substanța chimică de testare, cum ar fi măsurile de precauție pentru asigurarea siguranței, condițiile adecvate de depozitare și metodele analitice. Orientări cu privire la substanțele chimice de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (14).

7. Înainte de efectuarea unui test, sunt necesare următoarele informații privind substanța chimică de testare:

   — denumirea comună, denumirea chimică (de preferat, denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea;

   — presiunea de vapori;

   — solubilitatea în apă.

8. Următoarele informații suplimentare sunt considerate utile înainte de începerea testului:

   — coeficientul de partiție octanol/apă, K_{ow};

   — coeficientul de partiție carbon organic/apă, exprimat sub forma K_{oc};

   — hidroliza;

   — fototransformarea în apă;

   — biodegradabilitatea;

   — tensiunea superficială.

9. Înainte de începerea testului, trebuie obținute informații cu privire la anumite caracteristici ale sedimentului care urmează să fie utilizat (7). Pentru detalii a se vedea punctele (22)-(25).

PRINCIPIUL TESTULUI

10. Viermii aflați într-o stare fiziologică similară (sincronizați conform descrierii din apendicele 5) sunt expuși la o serie de concentrații toxice aplicate fazei de sediment a unui sistem sediment-apă. Ca mediu trebuie utilizate un sediment artificial și apă reconstituită. Vasele de testare fără adăugarea substanței chimice de testare servesc drept vase de control. Substanța chimică de testare este introdusă în sediment în cantitate mare pentru fiecare nivel de concentrație în vederea reducerii la minimum a variabilității între duplicatele pentru fiecare nivel de concentrație, iar organismele de testare sunt introduse ulterior în vasele de testare în care au fost echilibrate concentrațiile de sediment și de apă [a se vedea punctul (29)]. Animalele de testare sunt expuse la sistemele sediment-apă pentru o perioadă de 28 de zile. Având în vedere conținutul scăzut de nutrienți din sedimentul artificial, sedimentul trebuie îmbogățit cu o sursă de hrană (a se vedea punctele 22-23 și apendicele 4) pentru a garanta creșterea și reproducerea viermilor în condiții controlate. Se asigură astfel expunerea animalelor prin intermediul apei și a sedimentului, precum și prin intermediul hranei lor.

11. Punctul final preferat al acestui tip de studiu este EC_x (de exemplu,. EC_{50}, EC_{25} și EC_{10}; concentrația efectivă, care afectează x % din organismele de testare) pentru reproducere și, respectiv, biomasă comparativ cu vasul de control. Cu toate acestea, având în vedere gradul mare de incertitudine

▼M6

privind valorile scăzute ale EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{25}) cu limite de încredere de 95 % extrem de ridicate [de exemplu, (15)] și puterea statistică calculată pe parcursul verificării ipotezei, trebuie observat faptul că EC_{50} este considerată ca fiind punctul final cel mai fiabil. În plus, concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) și concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pot fi calculate pentru biomasă și reproducere, în cazul în care proiectul testului și datele susțin aceste calcule (a se vedea punctele 34-38). Scopul studiului, calculul EC_x sau NOEC, va determina proiectul testului.

TEST DE REFERINȚĂ

12. Se preconizează ca performanțele organismelor de control să demonstreze într-o măsură suficientă capacitatea unui laborator de a efectua testul și, în cazul în care sunt disponibile date istorice, repetabilitatea testului. În plus, pot fi efectuate, la intervale regulate, teste de toxicitate de referință utilizând o substanță toxică de referință pentru evaluarea sensibilității organismelor de testare. Numai testele de toxicitate de referință cu durata de 96 de ore pot demonstra într-un mod satisfăcător sensibilitatea și starea animalelor de testare (4)(7). Informații privind toxicitatea pentaclorfenolului (PCP) în teste efectuate (28 de zile de expunere la un sediment îmbogățit) sunt incluse în apendicele 6 și în raportul privind ring testul metodei de testare (13). Toxicitatea acută a PCP doar în prezența apei este descrisă, de exemplu, în referința (16). Aceste informații pot fi utilizate pentru compararea sensibilității organismelor de testare în testele de referință cu PCP ca substanță toxică de referință. Clorura de potasiu (KCl) sau sulfatul de cupru ($CuSO_4$) au fost recomandate ca substanțe toxice de referință pentru *L. variegatus* (4)(7). În prezent, este dificilă stabilirea unor criterii de calitate pe baza datelor privind toxicitatea pentru KCI din cauza lipsei de date din literatura de specialitate în ceea ce privește *L. variegatus*. Informații privind toxicitatea cuprului pentru *L. variegatus* sunt pot fi găsite în referințele (17)-(21).

VALIDITATEA TESTULUI

13. Pentru ca testul să fie valabil, trebuie să se îndeplinească următoarele cerințe:

— Un ring test (13) a demonstrat că în cazul *Lumbriculus variegatus*, numărul mediu de viermi vii per probă duplicat în vasele de control trebuie să fi crescut cu un factor de cel puțin 1,8 la finalul expunerii comparativ cu numărul de viermi per probă duplicat de la începutul expunerii.

— pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9 pe întreaga durată a testului.

— Concentrația de oxigen din apa acoperitoare nu trebuie să fie mai mică de 30 % din valoarea de saturație din aer (VSA) la temperatura de testare aplicată pe parcursul testului.

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Sistemul de testare

14. Se recomandă utilizarea sistemelor statice fără reînnoirea apei acoperitoare. În cazul în care raportul sediment/apă (a se vedea punctul 15) este corespunzător, o aerare ușoară va fi în mod normal suficientă pentru menținerea calității apei la niveluri acceptabile pentru organismele de testare (de exemplu, creșterea la maximum a nivelurilor de oxigen dizolvat, reducerea la minimum a acumulării de produse excretoare). Sistemele semistatice sau dinamice, cu reînnoire continuă sau intermitentă a apei acoperitoare pot fi utilizate numai în cazuri excepționale, întrucât se așteaptă ca reînnoirea periodică a apei acoperitoare să afecteze echilibrul chimic (de exemplu, pierderi de substanță chimică de testare din sistemul de testare).

Vasele și aparatura de testare

15. Expunerea trebuie realizată în pahare de laborator din sticlă, de exemplu, de 250 ml și cu un diametru 6 cm. Se pot utiliza și alte vase din sticlă corespunzătoare, dar acestea trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru apa acoperitoare și sediment. În fiecare vas trebuie introdus un strat de aproximativ 1,5-3 cm de sediment preparat. Raportul dintre

▼M6

adâncimea
stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie 1:4. Vasele trebuie să aibă o capacitate corespunzătoare conformă cu rata de încărcare, și anume numărul de viermi de testare adăugați pe unitatea ponderală de sediment (a se vedea, de asemenea, punctul 39).

16. Vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu substanța chimică de testare trebuie să fie în întregime din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert. A se evita, pentru toate componentele echipamentelor, utilizarea de materiale care pot dizolva și absorbi substanța chimică de testare sau care pot elibera alte substanțe chimice și care pot avea un efect advers asupra animalelor de testare. Politetrafluoretilena (PTFE), oțelul inoxidabil și/sau sticla trebuie utilizate pentru orice echipament care intră în contact cu mediul de testare. Pentru substanțele chimice organice care se absorb în sticlă, ar putea fi necesară sticlă silanizată. În aceste situații, echipamentul va trebui eliminat după utilizare.

Specia de testare

17. Specia de testare utilizată în cadrul acestui tip de studiu este oligochetul de apă dulce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Această specie tolerează o gamă largă tipuri de sedimente și este utilizată pe scară largă pentru testarea toxicității și a bioacumulării din sedimente [de exemplu, (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Trebuie raportate originea animalelor de testare, confirmarea identității speciilor [de exemplu, (36)], precum și condițiile de cultură. Identificarea speciei nu este necesară înainte de fiecare test în cazul în care organismele provin dintr-o cultură internă.

Creșterea organismelor de testare

18. Pentru a avea un număr suficient de viermi pentru realizarea testelor de toxicitate asupra sedimentului, este utilă menținerea viermilor în cultura de laborator permanentă. Orientări privind metodele de creștere în laborator pentru *Lumbriculus variegatus* și sursele culturilor de pornire sunt furnizate în apendicele 5. Pentru detalii privind creșterea acestei specii, a se vedea referințele (3), (7), (27).

19. Pentru a garanta că testele sunt efectuate cu animale din aceeași specie, se recomandă stabilirea de specii individuale. Asigurați-vă că culturile și, în special, viermii utilizați în cadrul testelor nu prezintă boli și anomalii vizibile.

Apa

20. Se recomandă utilizarea, în cadrul testelor, de apă reconstituită conform capitolului C.1 din prezenta anexă (37) ca apă acoperitoare; aceasta poate fi utilizată și pentru culturile de viermi de laborator (pentru pregătire, a se vedea apendicele 2). Dacă este necesar, se poate utiliza apă naturală. Calitatea apei alese trebuie să permită creșterea și reproducerea speciilor de testare pe parcursul perioadelor de aclimatizare și de testare fără manifestarea vreunui aspect sau comportament anormal. S-a demonstrat că *Lumbriculus variegatus* supraviețuiește, crește și se reproduce în acest tip de apă (30) și este asigurată o standardizare maximă a condițiilor de testare și de creștere. În cazul în care se utilizează apă reconstituită, compoziția acesteia trebuie raportată, iar apa trebuie să fie caracterizată înainte de utilizare cel puțin în ceea ce privește pH-ul, conținutul de oxigen și duritate (exprimată în mg de $CaCO_3$/l). Analiza micropoluanților din apă înainte de utilizarea acesteia ar trebui să furnizeze informații utile (a se vedea, de exemplu, apendicele 3).

21. pH-ul apei acoperitoare trebuie să se încadreze între 6,0 și 9,0 (a se vedea punctul 13). În cazul în care se preconizează degajarea unei cantități mari de amoniac, se consideră utilă menținerea pH-ului în limitele de 6,0 și 8,0. Pentru testarea de exemplu a unor acizi organici slabi, se recomandă ajustarea pH-ului prin tamponarea apei care urmează să fie utilizată în cadrul testului, conform descrierii, de exemplu, din referința (16). Duritatea totală a apei care urmează să fie utilizată în cadrul testului trebuie să se încadreze între 90 și 300 mg de $CaCO_3$/litru de apă naturală. Apendicele 3 sintetizează alte criterii pentru o apă de diluție acceptabilă conform Orientării nr. 210 a OCDE (38).

▼M6

Sedimentul

22. Având în vedere că sedimentele naturale necontaminate provenite dintr-o anumită sursă ar putea să nu fie disponibile pe tot parcursul anului, iar organismele indigene, precum și prezența micropoluanților pot influența testul, trebuie utilizat de preferință un sediment preparat (denumit, de asemenea, sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Utilizarea unui sediment preparat limitează variabilitatea condițiilor de testare, precum și introducerea unei faune indigene. Următorul sediment preparat se bazează pe sedimentul artificial descris în referințele (6), (39) și (40). Este recomandat a fi utilizat în cadrul acestui tip de test [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:

(a) 4-5 % mușchi de turbă (greutate uscată); este important să se utilizeze turbă sub formă de pudră, grad de descompunere: „mediu", fin mărunțită (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm) și uscată numai cu aer.

(b) 20 ± 1 % (greutate uscată) argilă caolinică (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %).

(c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (nisip fin, granulație: ≤ 2 mm, însă > 50 % din particule trebuie să se încadreze în intervalul 50-200 μm).

(d) Apă deionizată, 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului, în plus față de componentele sedimentului uscat.

(e) Se adaugă carbonat de calciu de calitate chimică pură ($CaCO_3$) pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului.

(f) Conținutul total de carbon organic (TOC) din amestecul final trebuie să fie de 2 % (± 0,5 %) din greutatea uscată a sedimentului și trebuie să fie ajustat prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

(g) Hrana, de exemplu frunze de urzică mică (*Urtica* sp., în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consumul uman) sub formă de pulbere sau un amestec de frunze *Urtica* sp. sub formă de pulbere și celuloză alfa (1:1), la 0,4 – 0,5 % din greutatea uscată a sedimentului, în plus față de componentele sedimentului uscat; pentru detalii a se vedea apendicele 4.

23. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, de argilă caolinică, de hrană și de nisip. În plus față de cele enunțate la litera (g), în capitolul C.27 din prezenta anexă (6) sunt enumerate alte substanțe vegetale care trebuie utilizate ca sursă de hrană: frunze deshidratate de dud (*Morus alba*), trifoi alb (*Trifolium repens*), spanac (*Spinacia oleracea*) sau cereale.

24. Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul introducerii în sediment a substanței chimice de testare. Sursa de hrană aleasă trebuie să permită cel puțin o reproducere acceptabilă în vasele de control. Analiza micropoluanților din sedimentul artificial sau din constituenți înainte de utilizare ar putea furniza informații utile. În apendicele 4 este descris un exemplu de preparare a sedimentului. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați, dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul este suficient condiționat (a se vedea, de asemenea, punctul 25 și apendicele 4). Sedimentul artificial trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea constituenților, prin distribuția dimensiunii granulelor (procentul de nisip, de silt și de argilă), prin conținutul total de carbon organic (TOC), prin conținutul de apă și prin pH-ul său. Măsurarea potențialului redox este opțională.

25. Dacă este necesar, de exemplu în scopul unei testări specifice, sedimentele naturale provenite din locuri nepoluate pot servi, de asemenea, drept sediment de testare și/sau de cultură (3). Cu toate acestea, în cazul utilizării unui sediment natural, acesta trebuie caracterizat cel puțin prin originea (locul prelevării), pH-ul și conținutul de amoniac din apa interstițială, prin conținutul total de carbon organic (TOC) și prin conținutul de azot, prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de silt și de argilă) și

▼M6

prin procentul de apă (7) și nu trebuie să prezinte niciun fel de contaminare și alte organisme care ar putea concura cu organismele de testare sau care le-ar putea consuma. Măsurarea potențialului redox și a capacității de schimb de cationi este opțională. De asemenea, se recomandă ca, înainte de introducerea substanței chimice de testare, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior. La finalul acestei perioade de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată.

26. Calitatea sedimentului care urmează să fie utilizat trebuie să permită supraviețuirea și reproducerea organismelor de control pe parcursul perioadei de expunere fără manifestarea vreunui aspect sau comportament anormal. Viermii de control trebuie introduși în sediment, iar aceștia trebuie să ingereze sedimentul. Reproducerea în vasele de control trebuie să fie cel puțin conformă cu criteriile de validitate descrise la punctul 13. Prezența sau absența granulelor de fecale pe suprafața sedimentului, care indică ingestia sedimentului de către viermi, trebuie înregistrată și poate fi utilă pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește căile de expunere. Informații suplimentare privind ingestia sedimentului pot fi obținute cu ajutorul metodelor descrise în referințele (24), (25), (44) și (45), în care se specifică ingestia sedimentului sau selectarea particulelor în organismele de testare.

27. Procedurile de manipulare a sedimentelor naturale înainte de utilizarea acestora în laborator sunt descrise în referințele (3), (7) și (12). Pregătirea și depozitarea sedimentului artificial recomandat a fi utilizat în cadrul testului pe *Lumbriculus* sunt descrise în apendicele 4.

Aplicarea substanței chimice de testare

28. Substanța chimică de testare trebuie introdusă în sediment. Întrucât se estimează că cele mai multe substanțe chimice au o solubilitate scăzută în apă, acestea trebuie să fie dizolvate într-un solvent organic corespunzător (de exemplu, acetonă, n-hexan, ciclohexan), într-un volum cât mai mic posibil pentru a pregăti soluția stoc. Soluția stoc trebuie diluată cu același solvent pentru a pregăti soluțiile de testare. Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței chimice de testare în solventul ales ar trebui să reprezinte principalele criterii pentru selectarea unui agent de solubilizare adecvat. Pentru fiecare nivel de concentrație, trebuie utilizat același volum de soluție corespunzătoare. Sedimentul trebuie îmbogățit în cantitate mare pentru fiecare nivel de concentrație în vederea reducerii la minimum a variabilității între duplicate a concentrației substanței chimice de testare. Fiecare dintre soluțiile de testare este apoi amestecată cu nisip cuarțos conform descrierii de la punctul 22 (de exemplu, 10 g de nisip cuarțos pentru fiecare vas de testare). Pentru imersiunea completă a nisipului cuarțos, un volum cuprins între 0,20 și 0,25 ml/g este considerat suficient. Apoi, solventul trebuie evaporat complet. Pentru a reduce la minimum pierderile de substanță chimică de testare prin coevaporare (de exemplu, în funcție de presiunea de vapori a substanței chimice), nisipul acoperit trebuie utilizat imediat după uscare. Nisipul uscat este amestecat cu cantitatea adecvată de sediment preparat la nivelul de concentrație corespunzător. Cantitatea de nisip provenit din amestecul de substanță de testare și de nisip trebuie să fie luată în considerare în momentul preparării sedimentului (astfel, sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip). Principalul avantaj al acestei proceduri este acela că, în principiu, nu este introdus în sediment niciun fel de solvent (7). Alternativ, de exemplu în cazul sedimentului natural, substanța chimică de testare poate fi adăugată prin încorporarea unei părți de sediment uscat și fin măcinat conform descrierii de mai sus pentru nisipul cuarțos sau prin amestecarea substanței chimice de testare în sedimentul umed, evaporând apoi orice agent de solubilizarea utilizat. Trebuie să se asigure distribuirea completă și uniformă în sediment a substanței chimice de testare adăugate la sediment. Dacă este necesar,

▼M6

subeșantioanele pot fi analizate pentru a confirma concentrațiile vizate din sediment și pentru a determina gradul de omogenitate. De asemenea, ar putea fi utilă analiza subeșantioanelor soluțiilor de testare pentru a confirma concentrațiile vizate din sediment. Întrucât se utilizează un solvent pentru depunerea substanței chimice de testare peste nisipul cuarțos, trebuie utilizat un vas de control cu solvent pregătit cu aceeași cantitate de solvent ca și sedimentele de testare. Trebuie raportate metoda utilizată pentru îmbogățire și motivele alegerii unei anumite proceduri de îmbogățire diferită de cea descrisă mai sus. Metoda de îmbogățire poate fi adaptată la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare, de exemplu, pentru a se evita pierderile cauzate de volatilizare pe parcursul procesului de îmbogățire sau de echilibrare. Orientări suplimentare privind procedurile de îmbogățire sunt furnizate în Environment Canada (1995) (46).

29. După pregătirea sedimentului îmbogățit, distribuirea acestuia în vasele de testare duplicat și adăugarea de apă de testare, este de preferat să se permită distribuția substanței chimice de testare din sediment în faza apoasă [de exemplu, (3)(7)(9)]. De preferință, această operațiune trebuie să se facă în aceleași condiții de temperatură și aerare ca și cele utilizate în test. Perioada de echilibrare corespunzătoare depinde de sediment și de substanțele chimice și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4-5 săptămâni) [de exemplu, (27)(47)]. În cadrul acestui test nu este necesar un echilibru complet, însă se recomandă o perioadă de echilibrare cuprinsă între 48 de ore și 7 zile. Astfel, timpul de degradare a substanței chimice de testare va fi redus la minimum. În funcție de scopul studiului, de exemplu, atunci când sunt reproduse condițiile de mediu, sedimentul îmbogățit poate fi echilibrat sau maturat pentru o perioadă mai mare.

30. La finalul acestei perioade de echilibrare, trebuie prelevate probe cel puțin din apa acoperitoare și din masa de sediment, cel puțin la cea mai mare și la cea mai mică concentrație pentru analiza concentrației substanței chimice de testare. Aceste determinări analitice ale substanței chimice de testare permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor inițiale măsurate. În general, prelevarea de probe împiedică sau distruge sistemul sediment-apă. În consecință, nu este posibil de obicei să se utilizeze aceleași duplicate pentru prelevarea de probe de sediment și viermi. Trebuie pregătite vase„analitice” suplimentare de dimensiuni corespunzătoare, tratate în același mod (inclusiv prin prezența organismelor de testare), însă nu trebuie utilizate pentru observații biologice. Dimensiunile vaselor de testare trebuie selectate pentru a preleva cantitățile de probe impuse de metoda analitică. Detalii privind prelevarea de probe sunt prezentate la punctul 53.

DESFĂȘURAREA TESTULUI

Testul preliminar

31. În cazul în care nu este disponibilă nicio informație privind toxicitatea substanței chimice de testare pentru *Lumbriculus variegatus*, ar putea fi utilă realizarea unui test preliminar pentru a determina intervalul de concentrații care trebuie testate în cadrul testului final și pentru a optimiza condițiile de testare ale testului final. În acest scop, se utilizează o serie de concentrații ale substanței chimice de testare, distribuite la intervale mari. Viermii sunt expuși la fiecare nivel de concentrație a substanței chimice de testare pentru o perioadă (de exemplu, 28 de zile ca în cazul testului final) care permite estimarea concentrațiilor de testare corespunzătoare; nu sunt necesare duplicate. Comportamentul viermilor, de exemplu evitarea sedimentului, care poate fi cauzată de substanța chimică de testare și/sau de sediment, trebuie observat și înregistrat pe parcursul unui test preliminar. Concentrațiile mai mari de 1 000 mg/kg de greutate uscată de sediment nu trebuie testate în cadrul testului preliminar.

Testul final

32. În cadrul testului final, trebuie utilizate și selectate cel puțin cinci concentrații, de exemplu pe baza rezultatului testului preliminar de stabilire a intervalului (punctul 31) și conform descrierii de la punctele 35, 36, 37 și 38.

▼M6

33. Un vas de control (pentru duplicare, a se vedea punctele 36, 37 și 38) care conține toți constituenții, cu excepția substanței chimice de testare, este tratat în paralel cu seria de testare. În cazul în care nu se utilizează niciun agent de solubilizare pentru aplicarea substanței chimice de testare, acest lucru nu ar trebui să aibă niciun efect semnificativ asupra organismelor de testare, astfel cum se demonstrează cu ajutorul unui vas de control suplimentar care conține doar solvent.

Proiectul testului

34. Proiectul testului se referă la selectarea numărului și a intervalelor de concentrații de testare, la numărul de vase pentru fiecare nivel de concentrație și la numărul de viermi adăugați pentru fiecare vas. Modelele pentru estimarea EC_x, pentru estimarea NOEC și pentru efectuarea unui test la valori-limită sunt descrise la punctele 35, 36, 37 și 38.

35. Concentrațiile efective (de exemplu, EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) și intervalul de concentrații în care efectul substanței de testare prezintă interes trebuie să fie cuprinse în seria concentrațiilor incluse în test. Trebuie evitată extrapolarea la valori mult sub cel mai mic nivel de concentrație care afectează organismele de testare sau la valori mai mari decât cel mai mare nivel de concentrație testată. Dacă – în cazuri excepționale – se realizează o astfel de extrapolare, trebuie furnizată o explicație completă în raport.

36. Dacă trebuie estimată valoarea EC_x, trebuie testate cel puțin cinci niveluri de concentrație și minimum trei probe duplicat pentru fiecare nivel de concentrație; se recomandă utilizarea a șase probe duplicat pentru vasul de control sau – în cazul în care este utilizat – pentru vasul de control cu solvent pentru a îmbunătăți estimarea variabilității între vasele de control. În orice caz, este recomandat să se utilizeze concentrații de testare suficiente, pentru a permite o bună estimare a modelului. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de răspuns a concentrației are o înclinare mică). Numărul de probe duplicat pentru fiecare tratament poate fi redus în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri cuprinse în intervalul 5 – 95 %. La creșterea numărului de probe duplicat sau la reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare, intervalele de încredere pentru test au tendința de a se îngusta.

37. În cazul în care trebuie estimate valorile LOEC/NOEC, trebuie utilizate cel puțin cinci concentrații de testare cu cel puțin patru probe duplicat (se recomandă șase probe duplicat pentru vasul de control sau – în cazul în care este utilizat – pentru vasul de control cu solvent pentru a îmbunătăți estimarea variabilității între vasele de control), iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei de testare sunt furnizate în apendicele 6.

38. Se poate efectua un test la valori-limită (utilizând o concentrație de testare și vase de control), în cazul în care nu se preconizează niciun efect până la 1 000 mg/kg de greutate uscată de sediment (de exemplu, în urma unui test preliminar de stabilire a intervalului) sau în cazul în care testarea la un singur nivel de concentrație va fi adecvată pentru confirmarea unei valori NOEC de interes. În acest din urmă caz, trebuie inclus în raportul de testare o argumentație detaliată a selectării concentrației-limită. Scopul testului la valori-limită este de a efectua un test la o concentrație suficient de mare pentru a permite factorilor de decizie să excludă efectele posibil toxice ale substanței chimice, iar limita este stabilită la o concentrație care nu este probabil să apară în nicio situație. Se recomandă 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin șase probe duplicat atât pentru tratament, cât și pentru probele de control. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei de testare sunt furnizate în apendicele 6.

Condiții de expunere

Organismele de testare

39. Testul se efectuează cu cel puțin 10 viermi pentru fiecare probă duplicat utilizată pentru determinarea parametrilor biologici. Acest număr de viermi corespunde cu aproximativ 50 – 100 mg de biomasă umedă. La un conținut de materie uscată estimat la 17,1 % (48), se obține aproximativ 9 – 17 mg de biomasă uscată per vas. U.S. EPA [2000 (7)] recomandă utilizarea unei

▼M6

rate de încărcare care să nu depășească 1: 50 (biomasă uscată: TOC). Pentru sedimentul preparat descris la punctul 22, această rată corespunde cu aproximativ 43 g de sediment (greutate uscată) pentru 10 viermi la un conținut TOC de 2,0 % de sediment uscat. În cazul utilizării unui număr mai mare de 10 viermi per recipient, cantitatea de sediment și de apă acoperitoare trebuie ajustată în consecință.

40. Viermii utilizați în cadrul unui test trebuie să provină toți din aceeași sursă și trebuie să se afle într-o stare fiziologică similară (a se vedea apendicele 5). Trebuie selectați viermi de dimensiuni similare (a se vedea punctul 39). Se recomandă ca un subeșantion din lotul sau stocul de viermi să fie cântărit înainte de test pentru estimarea greutății medii.

41. Viermii care urmează să fie utilizați în cadrul unui test sunt extrași din cultură (pentru detalii a se vedea apendicele 5). Animalele (adulte) de mari dimensiuni care nu prezintă semne de fragmentare recentă sunt transferate în recipiente din sticlă (de exemplu, vase Petri) care conțin apă curată. Acestea sunt apoi sincronizate conform descrierii din apendicele 5. După o perioadă de regenerare de 10-14 zile, trebuie utilizați pentru test viermii intacți și întregi de dimensiuni similare, care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui ușor stimul mecanic. În cazul în care condițiile de testare diferă de condițiile de cultură (de exemplu, în ceea ce privește temperatura, lumina și apa acoperitoare), o etapă de aclimatizare, de exemplu, de 24 de ore cu parametri de temperatură, de lumină și de apă acoperitoare identici cu cei ai testului ar trebui să fie suficientă pentru adaptarea viermilor la condițiile de testare. Oligochetele adaptate trebuie distribuite aleatoriu în vasele de testare.

Hrănirea

42. Întrucât hrana este adăugată la sediment înaintea (sau pe parcursul) aplicării substanței chimice de testare, viermii nu sunt hrăniți suplimentar pe parcursul testului.

Lumina și temperatura

43. Perioada de expunere la lumină aplicată culturii și în cadrul testului este de obicei de 16 ore (3), (7). Intensitatea luminii trebuie menținută la un nivel scăzut (de exemplu, 100-500 lx) pentru a imita condițiile naturale la suprafața sedimentului și trebuie măsurată cel puțin o dată pe parcursul perioadei de expunere. Temperatura trebuie să fie de 20 °C ± 2 °C pe tot parcursul testului. La o anumită dată de măsurare, diferența de temperatură dintre vasele de testare nu trebuie să fie mai mare de ± 1 °C. Vasele de testare trebuie așezate în incubatorul de testare sau în zona de testare într-un mod aleatoriu, de exemplu, pentru a reduce la minimum eroarea de reproducere determinată de locul vasului.

Aerarea

44. Apa acoperitoare din vasele de testare trebuie să fie supusă unui ușor proces de aerare (de exemplu, 2-4 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului astfel încât să limiteze perturbațiile. Concentrația de oxigen dizolvat nu trebuie să scadă sub 30 % din valoarea de saturație din aer (VSA). Aportul de aer trebuie controlat și – dacă este necesar – ajustat cel puțin o dată pe zi în zilele lucrătoare.

Măsurători ale calității apei

45. Următorii parametri de calitate a apei trebuie măsurați în apa acoperitoare:

Temperatura:	cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere; dacă este posibil, temperatura din mediul înconjurător (aerul înconjurător sau baia de apă) trebuie, de asemenea, înregistrată, de exemplu la intervale de o oră;

▼M6

Conținutul de oxigen dizolvat:	cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere; exprimat în mg/l și % din VSA (valoarea de saturație din aer);
Aportul de aer:	trebuie controlat cel puțin o dată pe zi în zilele lucrătoare și – dacă este necesar – trebuie ajustat;
pH-ul:	cel puțin într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație și într-un vas de testare dintre vasele de control, o dată pe săptămână și la începutul și la încheierea perioadei de expunere;
Duritatea totală a apei:	cel puțin într-o probă duplicat din vasele de control și într-un vas de testare cu cea mai mare concentrație la începutul și la încheierea perioadei de expunere; exprimată în mg/l $CaCO_3$;
Conținutul total de amoniac:	cel puțin într-o probă duplicat din vasele de control și într-un vas de testare cu fiecare nivel de concentrație la începutul și la încheierea perioadei de expunere și, ulterior, de 3 ori pe săptămână; exprimată în mg/l NH_4^+ sau NH_3 sau azot amoniacal total.

În cazul în care parametrii de calitate a apei necesită prelevarea unor probe semnificative de apă din vase, se recomandă pregătirea unor vase separate pentru efectuarea măsurătorilor calității apei astfel încât să nu se modifice raportul volumic apă-sediment.

Observații biologice

46. Pe parcursul expunerii, vasele de testare trebuie observate în vederea evaluării vizuale a oricărei diferențe de comportament manifestată de viermi (de exemplu, evitarea sedimentului, granule de fecale vizibile pe suprafața sedimentului) comparativ cu vasele de control. Observațiile trebuie înregistrate.

47. La finalul testului, fiecare probă duplicat este examinată (pot fi excluse de la examinare vasele suplimentare destinate analizelor chimice). Trebuie utilizată o metodă corespunzătoare pentru a recupera toți viermii din vasul de testare. Trebuie avut grijă ca toți viermii să fie recuperați nevătămați. O metodă posibilă este strecurarea viermilor din sediment. Poate fi utilizată o plasă din oțel inoxidabil cu o dimensiune adecvată a ochiurilor. Apa acoperitoare este decantată la maximum cu atenție, iar reziduurile de sediment și de apă sunt agitate pentru a obține o suspensie consistentă care poate fi strecurată. Dacă se utilizează o sită cu ochiuri de 500 μm, cea mai mare parte a particulelor de sediment vor trece foarte rapid prin aceasta; cu toate acestea, strecurarea trebuie efectuată rapid pentru a împiedica viermii să pătrundă în sită sau să treacă prin ochiurile acesteia. Utilizarea unei site cu ochiuri de 250 μm va împiedica viermii să pătrundă în sită sau să treacă prin ochiurile acesteia; cu toate acestea, a se avea grijă ca în sită să se rețină o cantitate cât mai mică posibil de particule de sediment. Suspensia strecurată din fiecare vas duplicat poate fi strecurată pentru a doua oară pentru a garanta recuperarea tuturor viermilor. O metodă alternativă ar putea fi încălzirea sedimentului prin așezarea vaselor de testare într-o baie de apă la o temperatură cuprinsă între 50 și 60 °C; viermii vor părăsi sedimentul și pot fi colectați de pe suprafața sedimentului cu ajutorul unei pipete cu gura largă lustruită la foc. O altă metodă constă în obținerea unei suspensii de sediment și turnarea acesteia într-un recipient puțin adânc cu o dimensiune corespunzătoare. Viermii pot fi extrași din stratul subțire de suspensie cu ajutorul unui ac din oțel sau al unei pensete de ceasornicar (care trebuie utilizată mai degrabă ca o furculiță decât ca un clește pentru a se evita rănirea viermilor) și transferați în apă curată. După separarea lor de suspensia de sediment, viermii sunt clătiți în mediul de testare și numărați.

48. Indiferent de metoda utilizată, laboratoarele trebuie să demonstreze că personalul lor poate recupera în medie cel puțin 90 % din organismele din

▼M6

întregul sediment. De exemplu, ar putea fi adăugat la sedimentul de probă sau la sedimentele de testare un anumit număr de organisme de testare, iar recuperarea acestora ar putea fi stabilită după 1 oră (7).

49. Numărul total de exemplare vii și moarte per probă duplicat trebuie înregistrat și evaluat. Sunt considerate moarte următoarele grupuri de viermi:

a) nu există nicio reacție după un stimul mecanic ușor;

b) există semne de descompunere (în combinație cu „a”)

c) mai mulți viermi lipsă

În plus, viermii vii pot fi încadrați în una dintre următoarele trei categorii:

a) viermi compleți de mari dimensiuni (adulți) fără regiuni de corp regenerate

b) viermi compleți cu regiuni de corp regenerate, de culoare mai deschisă (și anume cu o parte posterioară nouă, cu o parte anterioară nouă sau atât cu partea posterioară, cât și cu partea anterioară noi)

c) viermi incompleți (și anume, viermi fragmentați recent cu regiuni de corp neregenerate)

Aceste observații suplimentare nu sunt obligatorii, însă pot fi utilizate pentru o interpretare suplimentară a rezultatelor biologice (de exemplu, un număr mare de viermi incluși în categoria c poate indica o întârziere a reproducerii sau a regenerării determinată de un anumit tratament). În plus, dacă sunt observate eventuale diferențe de aspect (de exemplu, leziuni ale tegumentului, secțiuni de corp edematoase) între viermii tratați și cei din probele de control, acestea trebuie înregistrate.

50. Imediat după numărare/evaluare, viermii vii găsiți în fiecare probă duplicat sunt transferați în talere de balanță uscate, precântărite și etichetate (unul pentru fiecare probă duplicat) și eutanasiați cu o picătură de etanol pentru fiecare taler. Talerele sunt introduse într-o etuvă la o temperatură de 100 ± 5 °C pentru a se usca peste noapte, apoi sunt cântărite după răcire într-un exsicator și este determinată greutatea uscată a viermilor (de preferință în g, cu cel puțin 4 zecimale).

51. În plus față de greutatea uscată totală, poate fi determinată greutatea uscată fără cenușă conform descrierii de la referința (49) pentru a număra componentele anorganice provenite din sedimentul ingerat, prezente în tractul alimentar al viermilor.

52. Biomasa determinată este biomasa totală pentru fiecare probă duplicat, incluzând viermii adulți și cei tineri. Viermii morți nu trebuie luați în considerare pentru determinarea biomasei pentru fiecare probă duplicat.

Verificarea concentrațiilor de substanță chimică de testare

Prelevarea de probe

53. Probele pentru analiza chimică a substanței chimice de testare trebuie prelevate cel puțin la concentrația cea mai mare și la o concentrație inferioară, cel puțin la finalul fazei de echilibrare (înainte de adăugarea organismelor de testare) și la finalul testului. Trebuie prelevate pentru analiză cel puțin probe din masa sedimentului și din apa acoperitoare. Trebuie prelevate cel puțin două probe per matrice și per tratament la fiecare dată de prelevare. Una dintre probele duplicat poate fi păstrată ca rezervă (pentru a fi analizată, de exemplu, în cazul în care analiza inițială nu se încadrează în intervalul de ± 20 % al concentrației nominale). În cazul unor proprietăți chimice specifice, de exemplu dacă se preconizează o degradare rapidă a substanței

▼M6

chimice de testare, calendarul analitic poate fi ajustat (de exemplu, prelevări de probe mai frecvente, analiza mai multor niveluri de concentrație) pe baza avizului experților. Probele pot fi apoi prelevate la date de prelevare intermediare (de exemplu, la șapte zile după începerea perioadei de expunere).

54. Trebuie prelevate probe din apa acoperitoare prin decantarea sau sifonarea acesteia astfel încât să se reducă la minimum perturbarea sedimentului. Volumul probelor trebuie înregistrat.

55. După eliminarea apei acoperitoare, sedimentul trebuie să fie omogenizat și transferat într-un recipient corespunzător. Se înregistrează greutatea probei de sediment umed.

56. În cazul în care este necesară a analiză suplimentară a substanței chimice de testare din apa interstițială, probele de sediment omogenizat și cântărit trebuie centrifugate pentru a obține apă interstițială. De exemplu, aproximativ 200 ml de sediment umed pot fi introduse în pahare de laborator pentru centrifugare de 250 ml. Probele trebuie apoi centrifugate fără filtrare pentru a izola apa interstițială, de exemplu la 10 000 ± 600 × *g* timp de 30 – 60 de minute la o temperatură care să nu depășească temperatura utilizată în cadrul testului. După centrifugare, supernatantul este decantat sau prelevat cu pipeta având grijă să nu se introducă nicio particulă de sediment, iar volumul este înregistrat. Se înregistrează greutatea granulelor de sediment rămas. Acest lucru poate contribui la estimarea bilanțului masic sau a recuperării substanței chimice de testare din sistemul apă-sediment, în cazul în care greutatea uscată a sedimentului este determinată la fiecare dată de prelevare. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

57. În cazul în care analiza nu se realizează imediat, toate probele trebuie depozitate printr-o metodă corespunzătoare, de exemplu, în condițiile de depozitare recomandate pentru degradarea minimă a substanței chimice de testare specifice (de exemplu, probele prelevate din mediu sunt de obicei depozitate la o temperatură de – 18 °C la întuneric). Trebuie obținute informații privind condițiile corespunzătoare de depozitare pentru substanța chimică de testare specifică – de exemplu, durata și temperatura de stocare, procedurile de extracție etc. – înainte de începerea studiului.

Metoda analitică

58. Întrucât întreaga procedură este determinată în esență de exactitatea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța chimică de testare, trebuie să se verifice în mod experimental dacă precizia și reproductibilitatea, precum și recuperarea substanței chimice de testare din apă și din probele de sediment sunt satisfăcătoare pentru metoda specifică cel puțin la concentrația de testare cea mai mare și la concentrația de testare cea mai scăzută. De asemenea, trebuie să se verifice ca substanța chimică de testare să nu poată fi detectată în camerele de control la concentrații mai mari decât limita de cuantificare. Dacă este necesar, se ajustează concentrațiile nominale pentru a ține cont de recuperările din probele de control de calitate (de exemplu, în cazul în care recuperarea nu se încadrează în intervalul de 80 – 120 % din cantitatea introdusă). Pe întreaga durată a testului, toate probele trebuie manipulate astfel încât să se reducă la minimum contaminarea și pierderile (rezultate, de exemplu, din absorbția substanței chimice de testare pe dispozitivul de prelevare a probelor).

59. Trebuie înregistrate și raportate recuperarea substanței chimice de testare, limita de cuantificare și limita de detecție în sediment și în apă.

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

60. Principalele variabile de răspuns obligatorii ale testului care trebuie evaluate din punct de vedere statistic sunt biomasa și numărul total de viermi per probă duplicat. Opțional, reproducerea (creșterea numărului de viermi) și creșterea (creșterea biomasei uscate) ar putea fi, de asemenea, evaluate. În acest caz, o estimare a greutății uscate a viermilor la începutul perioadei de expunere trebuie obținută, de exemplu prin măsurarea greutății uscate a unui subeșantion reprezentativ din lotul viermilor sincronizați utilizați în cadrul testului.

▼M6

61. Cu toate că mortalitatea nu reprezintă un punct final de testare în prezentul test, aceasta ar trebui evaluată în măsura posibilului. În scopul estimării mortalității, numărul de viermi care nu reacționează la un stimul mecanic ușor sau care prezintă semne de descompunere, precum și viermii lipsă ar trebui considerați morți. Cazurile de mortalitate trebuie cel puțin înregistrate și luate în considerare în momentul interpretării rezultatelor.

62. Concentrațiile efective trebuie exprimate în mg/kg de greutate uscată de sediment. În cazul în care recuperarea substanței chimice de testare măsurată în sediment sau în sediment și în apa acoperitoare la începutul perioadei de expunere este cuprinsă între 80 și 120 % din concentrațiile nominale, concentrațiile efective (EC_x, NOEC, LOEC) pot fi exprimate pe baza concentrațiilor nominale. În cazul în care rata de recuperare se abate de la concentrațiile nominale cu un procent mai mare de ± 20 % din concentrațiile nominale, concentrațiile efective (EC_x, NOEC, LOEC) trebuie să se bazeze pe concentrațiile măsurate inițial la începutul perioadei de expunere, de exemplu luând în considerare bilanțul masic al substanței chimice de testare în sistemul de testare (a se vedea punctul 30). În aceste cazuri, informații suplimentare pot fi obținute din analiza soluțiilor stoc și/sau a soluțiilor de aplicare în vederea confirmării pregătirii corecte a sedimentelor de testare.

EC_x

63. Valorile EC_x pentru parametrii descriși la punctul 60 se calculează utilizând metodele statistice adecvate (de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Karber sau simpla interpolare). Orientări privind evaluarea statistică sunt disponibile în referințele (15) și (50). O valoare EC_x se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu x % din media probelor de control în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC_{50} sau a unei alte valori EC_x, mediile per tratament ($\overline{X}$) trebuie supuse unei analize de regresie.

NOEC/LOEC

64. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice corespunzătoare. În general, efectele adverse ale substanței de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la $p \leq 0{,}05$. Exemple sunt furnizate la punctele de mai jos. Orientări privind selectarea metodelor statistice adecvate sunt disponibile în referințele (15) și (50).

65. Distribuția normală a datelor poate fi testată, de exemplu cu ajutorul testului de calitate a ajustării Kolmogorov-Smirnov, al testului raportului interval/deviație standard (testul R/s) sau al testului Shapiro-Wilk (bilateral, $p \leq 0{,}05$). Pentru testarea omogenității varianței, poate fi utilizat testul Cochran, testul Levene sau testul Bartlett (bilateral, $p \leq 0{,}05$). În cazul în care sunt îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitatea variantei), se pot efectua o analiză de varianță (ANOVA) unilaterală și teste multicomparative ulterioare. Comparațiile pe perechi (de exemplu, testul t Dunnett) sau testele de stabilire a tendințelor (de exemplu, testul Williams) pot fi utilizate pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ($p \leq 0{,}05$) între probele de control și diversele concentrații de substanță chimică de testare. În caz contrar, trebuie utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

Test la valori-limită

66. În cazul în care a fost efectuat un test la valori-limită (compararea probei de control cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), răspunsurile metrice (numărul total de viermi și biomasa ca greutate uscată de viermi) pot fi evaluate prin intermediul testului Student (testul t). Se poate utiliza testul t pentru variante (testul t Welch) sau un test neparametric, precum testul U Mann-Whitney, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe. Anumite informații privind puterea statistică determinată pe parcursul testării ipotezei în cadrul ring testului metodei sunt furnizate în apendicele 6.

▼M6

67. Pentru determinarea diferențelor semnificative între vasele de control (vasul de control și vasul de control cu solvent), probele duplicat ale fiecărui vas de control pot fi testate conform descrierilor pentru testul la valori-limită. În cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate probele duplicat ale vaselor de control și ale vaselor de control cu solvent pot fi cumulate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu vasul de control cu solvent.

Interpretarea rezultatelor

68. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul unor abateri de la prezenta metodă de testare și în cazul în care concentrațiile de testare măsurate ating niveluri apropiate de limita de detecție a metodei analitice utilizate. Orice abatere de la prezenta metodă de testare trebuie notată.

Raportul de testare

69. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

— *Substanța chimică de testare*

— datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică pentru cuantificarea substanței chimice de testare; sursa substanței chimice de testare, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat.

— orice informație disponibilă privind natura fizică și proprietățile fizico-chimice obținute înainte de începerea testului (de exemplu, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, coeficientul de partiție în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), log K_{ow}, stabilitatea în apă etc.);

— *Specia de testare:*

— denumirea științifică, sursa, toate condițiile de pretratament, de aclimatizare, de cultură etc.

— *Condiții de testare:*

— procedura de testare utilizată (de exemplu, statică, semistatică sau în regim dinamic);

— proiectul testului (de exemplu, numărul, materialul și dimensiunea camerelor de testare, volumul de apă per vas, masa și volumul sedimentului per vas, (pentru procedurile în regim dinamic sau semistatic: viteza de înlocuire a volumului de apă), orice tip de aerare utilizat înainte și pe parcursul testului, numărul de probe duplicat, numărul de viermi per probă duplicat la începutul perioadei de expunere, numărul de concentrații de testare, durata condiționării, perioadele de echilibrare și de expunere, frecvența prelevării probelor);

— adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare;

— metoda de pretratare a substanței chimice de testare și procesul de îmbogățire/aplicare;

— concentrațiile de testare nominale, detalii privind prelevarea de probe pentru analize chimice și metodele analitice prin care au fost obținute concentrațiile substanței chimice de testare;

— caracteristicile sedimentului descrise la punctele 24-25 și orice altă măsurătoare efectuată; pregătirea sedimentului preparat;

— pregătirea apei de testare (dacă se utilizează apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, conductivitate, duritate și orice altă măsurătoare efectuată) înainte de începerea testului;

— informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire;

▼**M6**

— intensitatea luminii și perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— metodele utilizate pentru determinarea tuturor parametrilor biologici (de exemplu, prelevarea de probe, inspecția, cântărirea organismelor de testare) și a tuturor parametrilor abiotici (de exemplu, parametrii de calitate a apei și a sedimentului);

— volumul și/sau greutatea tuturor probelor destinate analizei chimice;

— informații detaliate privind tratamentul tuturor probelor destinate analizei chimice, inclusiv detalii privind pregătirea, depozitarea, procedurile de îmbogățire, extracția și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța chimică de testare și recuperările substanței chimice de testare.

— *Rezultate:*

— calitatea apei din vasele de testare (pH-ul, temperatura, concentrația de oxigen dizolvat, duritatea, concentrațiile de amoniac și orice altă măsurătoare efectuată);

— conținutul total de carbon organic (TOC), raportul greutate uscată/greutate umedă, pH-ul sedimentului și orice altă măsurătoare efectuată;

— numărul total și, în cazul în care este determinat, numărul viermilor complet și incomplet din fiecare cameră de testare la finalul testului;

— greutatea uscată a viermilor din fiecare cameră de testare la finalul testului și, dacă este măsurată, greutatea uscată a unui subeșantion de viermi la începutul testului;

— orice comportament anormal observat în comparație cu probele de control (de exemplu, evitarea sedimentului, prezența sau absența granulelor de fecale);

— orice caz de mortalitate observat;

— estimări ale punctelor finale toxice (de exemplu, EC_x, NOEC și/sau LOEC) și metodele statistice utilizate pentru determinarea acestora;

— concentrațiile de testare nominale, concentrațiile de testare măsurate și rezultatele tuturor analizelor efectuate în scopul determinării concentrației substanței chimice de testare din vasele de testare;

— orice abatere de la criteriile de validitate.

— *Evaluarea rezultatelor:*

— concordanța rezultatelor cu criteriile de validitate, astfel cum sunt enumerate la punctul 13;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la prezenta metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE

(1) CE (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxemburg.

(2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (OCDE), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. şi Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Capitolul C.27 din prezenta anexă, Test de toxicitate pe chironomide cu utilizarea de sediment îmbogățit.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Oblig. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicol. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Toxicol. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Toxicol. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Toxicol. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Toxicol. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Toxicol. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Toxicol. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼M6

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Toxicol. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Capitolul C.1 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe peşti.

(38) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germania. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Toxicol. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Toxicol. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Toxicol. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Toxicol. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

(50) OCDE 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OCDE Series on Testing and Assessment No. 54, OCDE Paris, Franța.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germania. pp. 107-119.

Bibliografie suplimentară privind procedurile statistice:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Toxicol. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Toxicol. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

În scopul prezentei metode de testare se utilizează următoarele definiții:

„Substanță chimică” înseamnă o substanță sau un amestec.

„Perioada de condiționare” este utilizată pentru stabilizarea componentei microbiene a sedimentului și pentru eliminarea, de exemplu, a amoniacului provenit din componentele sedimentului; aceasta se derulează înainte de îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare. De obicei, apa acoperitoare este eliminată după condiționare.

„EC_x” înseamnă concentrația substanței chimice de testare din sediment din care rezultă un efect de X % (de exemplu 50 %) asupra unui parametru biologic într-o perioadă de expunere dată.

„Perioada de echilibrare” este utilizată pentru a permite distribuirea substanței chimice de testare între faza solidă, apa interstițială și apa acoperitoare; aceasta se derulează după îmbogățirea sedimentului cu substanța chimică de testare și înainte de adăugarea organismelor de testare.

„Faza de expunere” este perioada pe parcursul căreia organismele de testare sunt expuse la substanța chimică de testare.

„Sedimentul preparat” sau sedimentul reconstituit, artificial sau sintetic este un amestec de materiale utilizate pentru simularea componentelor fizice a unui sediment natural.

„Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC)” este cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect toxic semnificativ (la $p \leq 0,05$) în raport cu proba de control. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. În cazul în care aceste două condiții nu pot fi îndeplinite, trebuie furnizată o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC).

„Concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC)” este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu proba de control, nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$), într-o perioadă de expunere dată.

„Coeficientul de partiție octanol/apă” (K_{ow}; exprimat uneori prin P_{ow}) este raportul solubilității unei substanțe chimice în n-octanol și în apă la echilibru și reprezintă lipofilia unei substanțe chimice (capitolul A.24 din prezenta anexă). K_{ow} sau logaritmul K_{ow} ($\log K_{ow}$) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare a unei substanțe chimice de către organismele acvatice.

„Coeficientul de partiție carbon organic/apă” (K_{oc}) este raportul dintre concentrația unei substanțe chimice în/pe fracția de carbon organic a unui sediment și concentrația de substanță chimică în apă la echilibru.

„Apa acoperitoare” este apa care acoperă sedimentul în vasul de testare.

„Apa interstițială” este apa care ocupă spațiul dintre particulele de sediment sau de sol.

„Sedimentul îmbogățit” este sedimentul la care se adaugă substanța chimică de testare.

„Substanța chimică de testare” înseamnă orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

▼**M6**

Apendicele 2

Compoziția apei reconstituite recomandate

[extras din Capitolul C.1 din prezenta anexă (1)]

(a) *Soluție de clorură de calciu*

Se dizolvă 11,76 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(b) *Soluție de sulfat de magneziu*

Se dizolvă 4,93 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(c) *Soluție de bicarbonat de sodiu*

Se dizolvă 2,59 g de $NaHCO_3$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(d) *Soluție de clorură de potasiu*

Se dizolvă 0,23 g de KCl în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

Toate substanțele chimice trebuie să fie de puritate analitică.

Conductivitatea apei distilate sau deionizate nu trebuie să depășească 10 μScm^{-1}.

Se amestecă 25 ml din fiecare dintre soluțiile menționate la litere (a)-(d) și se completează volumul total până la 1 litru cu apă deionizată. Suma ionilor de calciu și de magneziu din aceste soluții este de 2,5 mmol/l.

Proporția de ioni Ca:Mg este de 4:1, iar cea de ioni Na:K este de 10:1. Capacitatea acidă $K_{S4.3}$ a acestei soluții este de 0,8 mmol/l.

Se aerează apa de diluție până la obținerea saturației de oxigen, apoi se depozitează pentru o perioadă de aproximativ două zile fără o altă aerare înainte de utilizare.

REFERINȚĂ

(1) Capitolul C.1 din prezenta anexă, Test de toxicitate acută pe pești.

▼**M6**

Apendicele 3

Caracteristicile fizico-chimice ale unei ape de diluție acceptabile

Componentă	Concentrații
Particule în suspensie	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 µg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Pesticide organofosforice totale	< 50 ng/l
Pesticide organoclorurate totale plus bifenili policlorurați	< 50 ng/l
Clor organic total	< 25 ng/l
[extras din OCDE (1992) (1)]	

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Apendicele 4

Sediment artificial recomandat – Orientări privind prepararea și depozitarea

Constituenții sedimentului

Constituent	Caracteristici	% din greutatea uscată a sedimentului
Turbă	Mușchi de turbă, grad de descompunere: „mediu”, uscat cu aer, fără reziduuri vizibile, fin măcinat (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Nisip cuarțos	Granulație: ≤ 2 mm, însă > 50 % din particule trebuie să se încadreze în intervalul 50-200 μm	75 – 76
Argilă caolinitică	Conținut de caolinit ≥ 30 %	20 ± 1
Sursă de hrană	De exemplu, pulbere de Urtica (Folia urticae), frunze de Urtica dioica (urzică mică), fin măcinate (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm); în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consum uman; adăugate la sedimentul uscat	0,4 – 0,5 %
Carbon organic	Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip	2 ± 0,5
Carbonat de calciu	$CaCO_3$, pulverizat, pur din punct de vedere chimic, adăugat la sedimentul uscat	0,05 – 1
Apă deionizată	Conductivitate ≤ 10 μS/cm, adăugată la sedimentul uscat	30 – 50

Notă: în cazul în care sunt prevăzute concentrații ridicate de amoniac, de exemplu, dacă se știe că substanța chimică de testare inhibă nitrificarea, ar putea fi utilă înlocuirea a 50 % din pudra de urzică bogată în azot cu celuloză [de exemplu, pudră de α-celuloză, pură din punct de vedere chimic, dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm; (1) (2)].

Pregătire

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pulbere de turbă în apă deionizată, cu ajutorul unui dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță. pH-ul acestei suspensii este ajustat la 5,5 ± 0,5 cu $CaCO_3$. Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la 20 ± 2 °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. pH-ul se măsoară din nou și trebuie să fie de 6,0 ± 0,5. Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolinică) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă cuprins în intervalul 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară din nou pH-ul amestecului final și se ajustează în intervalul 6,5-7,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Cu toate acestea, în cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, poate fi utilă menținerea pH-ului sedimentului sub 7,0 (de exemplu între 6,0 și 6,5). Se prelevează probe din sediment, pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. În cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, sedimentul preparat poate fi condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior (de exemplu, raportul sediment-apă 1:4, adâncimea stratului de sediment identică cu cea din vasele de testare) înainte de a fi îmbogățit cu

▼M6

substanța chimică de testare, și anume acesta trebuie acoperit cu apă care trebuie aerată. La finalul perioadei de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Nisipul cuarțos îmbogățit este apoi amestecat cu sedimentul pentru fiecare nivel de tratament, sedimentul este distribuit în vasele de testare duplicat și acoperit cu apă de testare. Vasele sunt apoi incubate în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior. În acest moment începe perioada de echilibrare. Apa de acoperire trebuie să fie aerată.

Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul introducerii în sediment a substanței chimice de testare. Aceasta poate fi amestecată în prealabil cu suspensia de turbă (a se vedea mai sus). Cu toate acestea, degradarea excesivă a sursei de hrană înainte de adăugarea organismelor de testare – de exemplu, în cazul unei perioade lungi de echilibrare – poate fi evitată prin limitarea cât mai mult posibil a perioadei dintre momentul adăugării hranei și începutul expunerii. Pentru a garanta îmbogățirea hranei cu substanța chimică de testare, sursa de hrană trebuie amestecată cu sedimentul cel târziu în ziua introducerii substanței chimice în sediment.

Depozitare

Constituenții uscați ai sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros sau la temperatura camerei. Sedimentul preparat îmbogățit cu substanța chimică de testare trebuie utilizat imediat în cadrul testului. Probele de sediment îmbogățit pot fi depozitate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță chimică de testare.

BIBLIOGRAFIE

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germania. pp. 107-119.

▼M6

Apendicele 5

Metode de creștere a Lumbriculus variegatus

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), *Lumbriculidae*, Oligochete trăiește în sedimentele de apă dulce și este utilizat pe scară largă în testele ecotoxicologice. Acesta poate fi crescut cu ușurință în condiții de laborator. O descriere generală a metodelor de creștere este furnizată mai jos.

Metode de creștere

Condițiile de creștere a *Lumbriculus variegatus* sunt prezentate în detaliu în Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Un rezumat al acestor condiții este prezentat în continuare. Un avantaj important al *L. variegatus* este reproducerea sa rapidă, având ca rezultat o creștere rapidă a biomasei în rândul populațiilor crescute în laborator [de exemplu, (1), (3), (4), (5)].

Viermii pot fi crescuți în acvarii de mari dimensiuni (57 – 80 l) la o temperatură de 23 °C cu o perioadă de expunere de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric (100 – 1 000 lx) utilizând apă naturală reînnoită zilnic (45 – 50 l per acvariu). Substratul este preparat prin decuparea de fâșii din șervete de hârtie maro nealbită care apoi pot fi amestecate cu apa de cultură timp de câteva secunde pentru a obține mici bucăți de substrat de hârtie. Acest substrat poate fi apoi utilizat pentru a acoperi fundul rezervorului acvariului de cultură de *Lumbriculus* sau poate fi depozitat congelat în apă deionizată în vederea unei utilizări ulterioare. Noul substrat din rezervor va putea fi utilizat în general aproximativ două luni.

Fiecare cultură de viermi începe cu 500-1 000 de viermi care sunt hrăniți printr-o suspensie de 10 ml conținând 6 g de hrană de cultură de pornire pentru păstrăvi, de 3 ori pe săptămână, în condiții de reînnoire sau dinamice. În cazul culturilor statice sau semistatice vitezele de hrănire trebuie reduse pentru a preveni dezvoltarea de bacterii și de ciuperci.

În aceste condiții, numărul de exemplare din cultură se dublează în general în aproximativ 10-14 zile.

Alternativ, *Lumbriculus variegatus* poate fi crescut într-un sistem alcătuit dintr-un strat de nisip cuarțos ca cel utilizat pentru sedimentul artificial (1-2 cm adâncime) și din apă reconstituită. Se pot utiliza ca vase de cultură și recipiente din sticlă sau din oțel inoxidabil cu înălțimea cuprinsă între 12 și 20 cm. Întreaga cantitate de apă trebuie ușor aerată (de exemplu, 2 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului. Pentru a evita orice fel de acumulare, de exemplu de amoniac, apa acoperitoare trebuie schimbată utilizând un sistem în regim dinamic sau manual, cel puțin o dată pe săptămână. Oligochetele pot fi crescute la temperatura camerei cu o fotoperioadă de 16 ore de lumină (intensitate de 100 – 1 000 lx) și de 8 ore de întuneric. În cazul culturii semistatice (reînnoirea apei o dată pe săptămână), viermii sunt hrăniți cu TetraMin de două ori pe săptămână (de exemplu, 0,6 – 0,8 mg pe cm^2 de suprafață de sediment), care poate fi furnizat sub formă de suspensie de 50 mg de TetraMin pe ml de apă deionizată.

Lumbriculus variegatus poate fi extras din culturi, de exemplu, prin transferul într-un pahar de laborator separat a substratului cu ajutorul unei plase cu ochiuri fine sau prin transferul organismelor cu ajutorul unei pipete din sticlă cu gura largă (cu diametrul de aproximativ 5 mm) finisată la foc. În cazul în care substratul este transferat în același timp în respectivul pahar de laborator, recipientul care conține viermii și substratul este lăsat peste noapte în condiții dinamice, care vor permite eliminarea substratului din recipient, viermii rămânând pe fundul vasului. Aceștia pot fi apoi introduși în rezervoarele de cultură nou pregătite sau pregătiți ulterior pentru test conform descrierii din referințele (3) și (4) sau de la punctele de mai jos.

Atunci când se utilizează *L. variegatus* în cadrul testelor asupra sedimentului trebuie acordată atenție modului său de reproducere [arhitomie sau morfalaxă, de exemplu (6)]. Acest mod de reproducere asexuată are ca rezultat două fragmente, care nu se hrănesc o anumită perioadă până ce segmentul capului sau al cozii se regenerează [de exemplu, (7), (8)]. Acest lucru semnifică faptul că expunerea *L. variegatus* prin ingestia de sediment contaminat nu este un proces continuu.

▼M6

Prin urmare, trebuie realizată o sincronizare pentru reducerea la minimum a reproducerii și a regenerării necontrolate care determină o variație ridicată a rezultatelor testului. O astfel de variație poate apărea atunci când unele exemplare, care sunt fragmentate și care, în consecință, nu se hrănesc pentru o anumită perioadă, sunt expuse mai puțin la substanța chimică de testare decât alte exemplare care nu se fragmentează pe parcursul testului (9), (10), (11). Cu 10-14 zile înainte de expunere, viermii trebuie să fie fragmentați în mod artificial (sincronizare). Trebuie selectați pentru sincronizare viermi (adulți) de mari dimensiuni care, de preferință, nu prezintă niciun semn de morfalaxă recentă. Acești viermi pot fi așezați pe o lamelă din sticlă într-o picătură de apă de cultură și disecați cu ajutorul unui bisturiu în regiunea mediană a corpului. Trebuie avut grijă ca extremitățile posterioare să fie de dimensiuni similare. Extremitățile posterioare trebuie apoi lăsate să regenereze capete noi într-un vas de cultură care să conțină același substrat ca cel utilizat în cultură și apă reconstituită, până la începerea perioadei de expunere. Regenerarea de capete noi este indicată în momentul introducerii viermilor sincronizați în substrat (prezența capetelor regenerate poate fi confirmată prin examinarea la un microscop binocular a unui subeșantion reprezentativ. Organismele de testare sunt examinate ulterior pentru a se constata dacă se găsesc într-o stare fiziologică similară. Acest lucru înseamnă că, atunci când are loc reproducerea prin morfalaxă în cazul viermilor sincronizați pe parcursul testului, se estimează că practic toate animalele sunt expuse în aceeași măsură la sedimentul îmbogățit. Hrănirea viermilor sincronizați trebuie să se realizeze imediat ce viermii încep să pătrundă în substrat sau după 7 zile de la disecție. Regimul de hrănire trebuie să fie comparabil cu cel al culturilor normale, însă se recomandă hrănirea viermilor sincronizați cu aceeași sursă de hrană ca cea utilizată în cadrul testului. Viermii trebuie ținuți la o temperatură de testare, la 20 ± 2 °C. După regenerare, trebuie utilizați pentru test viermii întregi și intacți care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui stimul mecanic ușor. A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor scobitori din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

Surse de culturi de pornire pentru *Lumbriculus variegatus* [adrese din SUA extrase din referința (4)]

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germania

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germania

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Caseta 111
FIN-80101 Joensuu
Finlanda

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Germania

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

S.U.A.

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

BIBLIOGRAFIE

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. şi Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Toxicol. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. În ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumul 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. A doua ediție. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. şi Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Toxicol. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Toxicol. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Toxicol. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Toxicol. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Apendicele 6

Rezumatul rezultatelor ring testului

„Test de toxicitate asupra sedimentului cu *Lumbriculus variegatus*"

Tabelul 1

Rezultatele ciclurilor individuale ale ring testului: numărul mediu de viermi din vasele de control și din vasele de control cu solvent la finalul testului; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.

	numărul mediu de viermi din vasele de control	SD	CV (%)	n	numărul mediu de viermi din vasele de control cu solvent	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
media interlaboratoare	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
min	**16,3**				**15,0**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabelul 2

Rezultatele ciclurilor individuale ale ring testului: greutatea uscată medie totală a viermilor per probă duplicat în vasele de control și în vasele de control cu solvent la finalul testului; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.

	greutatea uscată totală a viermilor per probă duplicat (vase de control)	SD	CV (%)	n	greutatea uscată totală a viermilor per probă duplicat (vase de control cu solvent)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
media interlaboratoare	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
min	**12,9**				**10,5**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabelul 3

Toxicitatea PCP: Rezumatul punctelor finale în cadrul ring testului; mediile interlaboratoare pentru EC_{50}, NOEC și LOEC; SD = abatere standard; CV = coeficient de variație.

parametru biologic		media interlaboratoare (mg/kg)	min.	max.	factor interlaboratoare	SD	CV (%)	media geometrică (mg/kg)
numărul total de viermi	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
greutatea uscată totală a viermilor	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
mortalitate/ supraviețuire	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
reproducere (creșterea numărului de viermi per probă duplicat)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
creștere (creșterea biomasei per probă duplicat)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: diferența detectabilă minimă în raport cu valorile probelor de control pe parcursul testării ipotezei; utilizată ca o măsură a puterii statistice

BIBLIOGRAFIE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. TEST DE REPRODUCERE A UNUI ACARIAN PRĂDĂTOR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] DIN SOL

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) 226 (2008). Prezenta metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele substanțelor chimice din sol asupra ratei de reproducere a unei specii de acarian din sol, *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), permițând astfel estimarea inhibiției ritmului de creștere specific al unei populații (1,2). În acest caz, capacitatea de reproducere semnifică numărul de exemplare tinere la finalul perioadei de testare. *H. aculeifer* reprezintă un nivel trofic suplimentar față de speciile pentru care sunt deja disponibile metode de testare. În scopul prezentei metode de testare, un test de reproducere fără discriminare și cuantificare a diferitelor stadii ale ciclului de reproducere este considerat adecvat. Pentru substanțele chimice al căror mod de expunere nu implică solul, ar putea fi adecvate alte abordări (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* este considerat un reprezentant relevant al faunei din sol și, în special, al acarienilor prădători. Acesta este răspândit în toată lumea (5) și poate fi colectat și înmulțit cu ușurință în laborator. Un rezumat al biologiei speciei de *H. aculeifer* este prezentat în apendicele 7. Informații de referință privind ecologia speciilor de acarieni și utilizarea acestora în cadrul testelor ecotoxicologice sunt disponibile în referințele (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Femelele adulte sunt expuse la o serie de concentrații ale substanței chimice de testare amestecate în sol. La începutul testului, în fiecare vas duplicat sunt introduse câte 10 femele adulte. Masculii nu sunt incluși în test deoarece experiența a demonstrat că femelele se împerechează imediat sau la scurt timp după ecloziune în stadiul de deutonimfă, în cazul în care masculii sunt prezenți. În plus, includerea masculilor ar prelungi durata testului întrucât ar fi necesară o diferențiere laborioasă a stadiilor de dezvoltare. În consecință, împerecherea în sine nu constituie parte a testului. Femelele sunt incluse în test după 28-35 de zile de la începerea perioadei de pontă în cadrul procesului de sincronizare (a se vedea apendicele 4), deoarece se poate considera în acest caz că femelele deja s-au împerecheat și au trecut în etapa anterioară pontei ovulare. La o temperatură de 20 °C, testul se încheie în cea de a 14-a zi după includerea femelelor (ziua 0), ceea ce permite primilor descendenți din grupurile de control să atingă stadiul de deutonimfă (a se vedea apendicele 4). Pentru calcularea principalei variabile măsurate, se stabilește numărul de exemplare tinere pentru fiecare vas de testare, precum și numărul de femele supraviețuitoare. Rata de reproducere a acarienilor expuși la substanța chimică de testare este comparată cu cea a acarienilor din grupurile de control pentru a determina EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}) sau concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) (pentru definiții, a se vedea apendicele 1), în funcție de proiectul experimentului (a se vedea punctul 29). O prezentare generală a calendarului testelor este inclusă în apendicele 8.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

4. Ar fi de preferat să se cunoască solubilitatea în apă, log K_{ow}, coeficientul de partiție sol/apă și presiunea de vapori a substanței de testare. Sunt de dorit informații suplimentare privind evoluția substanței chimice de testare în sol, precum viteza de degradare biotică și abiotică.

5. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței de testare va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție sol/apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea de vapori depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

▼M6

VALIDITATEA TESTULUI

6. Pentru ca un rezultat să fie considerat valabil, grupurile de control netratate trebuie să îndeplinească următoarele criterii:

— Rata medie a mortalității în rândul femelelor adulte nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului;

— Numărul mediu de exemplare tinere per vas duplicat (cu 10 femele adulte incluse) trebuie să fie de cel puțin 50 la finalul testului;

— Coeficientul de variație calculat pentru numărul de exemplare tinere de acarieni per vas duplicat nu trebuie să fie mai mare de 30 % la încheierea testului final.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

7. Trebuie determinată valoarea ECx și/sau NOEC a unei substanțe chimice de referință pentru a garanta caracterul adecvat al condițiilor de testare din laborator și pentru a verifica regularitatea răspunsului organismelor de testare în timp. Dimetoatul (CAS 60-51-5) este o substanță chimică de referință corespunzătoare care și-a demonstrat efectul asupra dimensiunii populației (4). Acidul boric (CAS 10043-35-3) poate fi utilizat ca o substanță chimică de referință alternativă. Experiența dobândită în cazul acestei substanțe chimice este limitată. Sunt posibile două opțiuni conceptuale:

— Substanța chimică de referință poate fi testată în paralel cu determinarea toxicității fiecărei substanțe de testare la o concentrație demonstrată în prealabil în cadrul unui studiu doză-răspuns pentru a provoca o reducere > 50 % a numărului descendenților. În acest caz, numărul probelor duplicat trebuie să fie același cu cel din vasele de control (a se vedea punctul 29).

— Alternativ, substanța chimică de referință este testată de 1-2 ori pe an în cadrul unui test doză-răspuns. În funcție de modelul ales, numărul de concentrații și de probe duplicat și factorul de separare variază (a se vedea punctul 29), însă trebuie obținut un răspuns echivalent cu 10-90 % din efect (factor de separare de 1,8). Valoarea EC_{50} a dimetoatului calculată pe baza numărului de exemplare tinere trebuie să se încadreze în intervalul cuprins între 3,0 și 7,0 mg a.s./kg de sol (greutate uscată). Pe baza rezultatelor obținute până în prezent cu acidul boric, valoarea EC_{50} bazată pe numărul de exemplare tinere trebuie să se încadreze în intervalul cuprins între 100 și 500 mg/kg greutate uscată a solului.

DESCRIEREA TESTULUI

Vasele și echipamentele de testare

8. Trebuie utilizate vase de testare cu diametrul de 3-5 cm (înălțimea solului ≥1,5 cm), din sticlă sau dintr-un alt material chimic inert și prevăzute cu un capac corespunzător. A se utiliza de preferință capace cu filet și, în acest caz, vasele ar putea fi aerate de două ori pe săptămână. Alternativ, pot fi utilizate capace care permit un schimb direct de gaze între substrat și atmosferă (de exemplu, tifon). Întrucât gradul de umiditate trebuie să rămână suficient de mare pe parcursul testului, este esențial să se verifice greutatea fiecărui vas de control pe parcursul testului și să se adauge apă dacă este necesar. Acest lucru este important în special în cazul în care nu sunt disponibile capace cu filet. În cazul în care este utilizat un vas de testare opac, capacul trebuie să fie dintr-un material care să permită accesul luminii (de exemplu, printr-un capac transparent perforat) împiedicându-i în același timp pe acarieni să scape. Dimensiunea și tipul vasului de testare depinde de metoda de extracție (pentru detalii, a se vedea apendicele 5). În cazul aplicării unei extracții la căldură direct pe vasul de testare, ar putea fi adăugată pe fundul vasului o plasă cu ochiuri de dimensiuni corespunzătoare (sigilată până în momentul extracției), iar adâncimea solului trebuie să fie suficientă pentru a permite stabilirea unui gradient de temperatură și de umiditate.

▼M6

9. Sunt necesare echipamente de laborator standard, care să includă, în special, următoarele:

— vase, de preferință din sticlă cu capace cu filet;

— dulap pentru uscare;

— stereomicroscop;

— pensule pentru transferul acarienilor

— pH-metru și luxmetru;

— cântare de precizie adecvate;

— echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;

— echipamente adecvate pentru controlul umidității aerului (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt acoperite cu capace);

— incubator sau o cameră mică cu temperatură controlată;

— echipamente de extracție (a se vedea apendicele 5) (13)

— panou luminos suspendat cu sistem de control al luminii

— borcane de colectare pentru acarienii extrași.

Pregătirea solului artificial

10. Pentru prezentul test, se utilizează un sol artificial. Solul artificial include următoarele componente (toate valorile se bazează pe masa uscată):

— 5 % mușchi de turbă, uscat cu aer și fin măcinat (se acceptă o dimensiune a particulelor de 2 ±1 mm);

— 20 % argilă caolinică (de preferință, conținut caolinit de peste 30 %);

— aproximativ 74 % de nisip industrial uscat cu aer (în funcție de cantitatea de $CaCO_3$ necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni. Cantitatea exactă de nisip depinde de cantitatea de $CaCO_3$ (a se vedea mai jos), proporția combinată a celor două componente trebuie să atingă 75 %.

— < 1,0 % carbonat de calciu ($CaCO_3$, pulverizat, puritate analitică) pentru a obține un pH de 6,0 ± 0,5; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei (a se vedea Nota 1).

Nota 1: Cantitatea de $CaCO_3$ necesară va depinde de componentele substratului de sol și trebuie determinată prin măsurarea pH-ului subeșantioanelor de sol chiar înainte de test (14).

Nota 2: Conținutul de turbă din solul artificial diferă de cea recomandată în cadrul altor metode de testare a organismelor din sol pentru care se utilizează în cele mai multe cazuri un procent de 10 % turbă [de exemplu (15)]. Cu toate acestea, conform OEPP (16), un sol agricol tipic nu conține mai mult de 5 % materie organică, iar diminuarea conținutului de turbă reflectă astfel posibilitățile reduse ale unui sol natural de sorbție a substanței chimice de testare în raport cu carbonul organic.

Nota 3: Dacă este necesar, de exemplu în scopul unei testări specifice, solurile naturale provenite din locuri nepoluate pot servi, de asemenea, ca substrat de testare și/sau de cultură. Cu toate acestea, în cazul în care se utilizează sol natural, acesta trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea (locul colectării), pH-ul și textura sa (distribuția dimensiunii particulelor) și conținutul său de materie organică. Dacă sunt disponibile, trebuie incluse tipul și denumirea solului conform clasificării solurilor, iar solul nu trebuie să fie contaminat. În cazul în care substanța chimică de testare este un metal

▼M6

sau un compus organometalic, trebuie determinată, de asemenea, capacitatea de schimb cationic (CEC) a solului natural. Trebuie acordată o atenție specială respectării criteriilor de validitate întrucât informațiile de referință privind solurile naturale sunt în general rare.

11. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un amestecător de laborator mare). Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și de soluție de clorură de potasiu 1 M (KCl) sau de clorură de calciu 0,01 M ($CaCl_2$) într-un raport de 1:5 [a se vedea referința (14) și apendicele 3]. Dacă aciditatea solului este mai mare decât limita impusă (a se vedea punctul 10), aceasta poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de $CaCO_3$. Dacă solul este prea alcalin, acest lucru poate fi ajustat prin adăugarea unei cantități suplimentare din amestecul care conține primele trei componente descrise la punctul 10, cu excepția $CaCO_3$.

12. Capacitatea maximă de retenție a apei (WHC) a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 2. Cu două-șapte zile înainte de începerea testului, solul artificial uscat este umezit în prealabil prin adăugarea unei cantități suficiente de apă distilată sau deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă, adică 40-60 % din WHC maximă. Gradul de umiditate este ajustat la 40-60 % din WHC maximă prin adăugarea soluției de substanță de testare și/sau prin adăugarea de apă distilată sau deionizată (a se vedea punctele 16-18). Se poate realiza o verificare suplimentară aproximativă a gradului de umiditate din sol strângând ușor solul în mână; în cazul în care gradul de umiditate este cel corect, trebuie să apară între degete picături mici de apă.

13. Gradul de umiditate din sol este determinat, la începutul și la finalul testului, prin uscare la o temperatură de 105 °C până la obținerea unei greutăți constante în conformitate cu standardul ISO 11465 (17) și a unui pH al solului în conformitate cu anexa 3 sau cu standardul ISO 10390 (14). Aceste măsurători trebuie efectuate pe probe suplimentare fără acarieni, atât pentru solul de control, cât și pentru solul cu fiecare concentrație de testare. pH-ul solului nu trebuie ajustat atunci când sunt testați acizi sau baze. Gradul de umiditate trebuie să fie monitorizat pe întreaga perioadă a testului prin cântărirea periodică a vaselor (a se vedea punctele 20 și 24).

Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare

14. Specia utilizată în cadrul testului este *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Pentru începerea testului, sunt necesare femele adulte de acarieni, prelevate dintr-un grup sincronizat. Acarienii trebuie incluși după aproximativ 7-14 zile de la trecerea la stadiul de adult, după 28-35 de zile de la începerea perioadei de pontă în cadrul procesului de sincronizare (a se vedea punctul 3 și apendicele 4). Trebuie să se înregistreze sursa acarienilor sau furnizorul acestora și întreținerea culturii de laborator. În cazul în care este menținută o cultură de laborator, se recomandă ca identitatea speciilor să fie confirmată cel puțin o dată pe an. O fișă de identificare este inclusă în anexa 6.

Pregătirea concentrațiilor de testare

15. Substanța de testare este amestecată în sol. Solvenții organici utilizați pentru facilitarea tratamentului solului cu substanța chimică de testare trebuie selectați pe baza toxicității lor scăzute pentru acarieni și trebuie inclus în proiectul de testare un vas de control cu solvent (a se vedea punctul 29).

Substanța chimică de testare solubilă în apă

16. O soluție a substanței de testare este pregătită în apă deionizată într-o cantitate suficientă pentru toate duplicatele cu o concentrație de testare. Se recomandă utilizarea unei cantități corespunzătoare de apă pentru a obține gradul de umiditate necesar, și anume 40-60 % din WHC maximă (a se vedea punctul 12). Fiecare soluție a substanței de testare se amestecă bine cu o probă de sol umezit în prealabil înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

▼M6

Substanța chimică de testare insolubilă în apă

17. În cazul substanțelor chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică de testare poate fi dizolvată în cel mai mic volum posibil al unui dizolvant adecvat (de exemplu, acetonă). Trebuie utilizați numai solvenți volatili. În cazul în care sunt utilizați astfel de dizolvanți, toate concentrațiile de testare și vasul de control trebuie să conțină aceeași cantitate minimă de dizolvant. Dizolvantul este pulverizat sau amestecat cu o cantitate redusă, de exemplu 10 g, de nisip cuarțos. Conținutul total de nisip din substrat trebuie corectat în funcție de această cantitate. Dizolvantul este eliminat prin evaporare sub o hotă timp de cel puțin o oră. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul umezit în prealabil și se amestecă bine adăugând o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține umiditatea dorită. Amestecul final este introdus în vasele de testare. A se avea în vedere faptul că anumiți solvenți pot fi toxici pentru acarieni. Prin urmare, se recomandă utilizarea unui vas de control suplimentar cu apă fără dizolvant, în cazul în care nu se cunoaște toxicitatea solventului pentru acarieni. În cazul în care se demonstrează în mod corespunzător că solventul (în concentrațiile care trebuie aplicate) nu are niciun efect, vasul de control cu apă poate fi exclus.

Substanță chimică puțin solubilă în apă și solvenți organici

18. În cazul substanțelor chimice puțin solubile în apă și solvenți organici, echivalentul de 2,5 g de nisip cuarțos fin măcinat pentru fiecare vas de testare (de exemplu, 10 g de nisip cuarțos fin pentru patru duplicate) este amestecat cu cantitatea de substanță chimică pentru a obține concentrația de testare dorită. Conținutul total de nisip din substrat trebuie corectat în funcție de această cantitate. Acest amestec de nisip cuarțos și de substanță chimică de testare se adaugă la solul umezit în prealabil și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține gradul de umiditate dorit. Amestecul final este distribuit în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, un vas de control corespunzător.

PROCEDURA

Grupuri de testare și vase de control

19. Pentru fiecare vas de control și de tratament, se recomandă utilizarea a zece femele adulte în 20 g de masă de sol artificial. Organismele de testare trebuie adăugate într-un interval de două ore după pregătirea substratului de testare final (și anume, după aplicarea substanței de testare). În anumite cazuri (de exemplu, atunci când îmbătrânirea este considerată un factor determinant), intervalul de timp între pregătirea substratului de testare final și adăugarea acarienilor trebuie prelungit [pentru detalii privind îmbătrânirea, a se vedea referința (18)]. Cu toate acestea, în astfel de cazuri, trebuie furnizată o justificare științifică.

20. După adăugarea acarienilor în sol, aceștia sunt hrăniți, iar greutatea inițială a fiecărui vas de testare trebuie măsurată pentru a fi utilizată ca referință pentru monitorizarea gradului de umiditate a solului pe tot parcursul testului, conform descrierii de la punctul 24. Vasele de testare sunt apoi acoperite conform descrierii de la punctul (8) și așezate în camera de testare.

21. Sunt pregătite vase de control corespunzătoare pentru fiecare dintre metodele de aplicare a substanței chimice de testare descrise la punctele 15-18. Sunt urmate procedurile relevante descrise pentru pregătirea vaselor de control, fără a se adăuga substanța chimică de testare. Astfel, dacă este cazul, se adaugă în vasele de control solvenți organici, nisip cuarțos sau alți dizolvanți în concentrații/cantități echivalente cu cele din vasele de tratament. Atunci când se utilizează un solvent sau un alt dizolvant pentru a adăuga substanța chimică de testare, trebuie pregătit și testat, de asemenea, un vas de control fără dizolvant sau substanța chimică de testare în cazul în care nu se cunoaște toxicitatea solventului (a se vedea punctul 17).

▼M6

Condiții de testare

22. Temperatura de testare trebuie să fie de 20 ± 2 °C. Temperatura trebuie înregistrată cel puțin zilnic și ajustată, dacă este necesar. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință, 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în apropiere de vasele de testare. Din motive de compatibilitate, aceste condiții sunt identice ca și în cazul celorlalte teste ecotoxicologice ale solului [de exemplu, referința (15)].

23. Schimbul de gaze trebuie garantat prin aerarea vaselor de testare de două ori pe săptămână în cazul în care sunt utilizate capace cu filet. În cazul utilizării unor capace din tifon, trebuie acordată o atenție specială menținerii gradului de umiditate a solului (a se vedea punctele 8 și 24).

24. Gradul de umiditate a substratului de sol din vasele de testare este menținut pe tot parcursul testului prin cântărire și, dacă este necesar, prin adăugarea periodică de apă în vasele de testare (de exemplu, o dată pe săptămână). Dacă este necesar, pierderile sunt compensate cu apă deionizată. Gradul de umiditate a solului pe parcursul testului nu trebuie să difere cu mai mult de 10 % din valoarea inițială.

Hrănirea

25. S-a demonstrat că acarienii de brânză [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] reprezintă o sursă de hrană adecvată. Pot fi, de asemenea, adecvate colembolele de mici dimensiuni [de exemplu, exemplare tinere de *Folsomia candida* Willem, 1902 sau *Onychiurus fimatus* (19), (20), enchitreide (de exemplu, *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) sau nematode (de exemplu, *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)] (21). Se recomandă verificarea hranei înainte de utilizarea sa în cadrul testului. Tipul și cantitatea de hrană trebuie să asigure obținerea unui număr adecvat de exemplare tinere pentru a îndeplini criteriile de validitate (punctul 6). Pentru selectarea prăzii, trebuie luat în considerare modul de acțiune al substanței de testare (de exemplu, un acaricid poate fi toxic și pentru acarienii utilizați ca hrană; a se vedea punctul 26).

26. Hrana trebuie furnizată *ad libitum* [și anume, de fiecare dată într-o cantitate mică (vârful unei spatule)]. În acest scop, poate fi utilizat și un aspirator cu aspirație ușoară astfel cum este propus în testul asupra colembolelor sau o pensulă de vopsit fină. De obicei, va fi suficientă furnizarea de hrană la începutul testului și de două-trei ori pe săptămână. Atunci când substanța de testare pare a fi toxică pentru pradă, trebuie luată în considerare o creștere a frecvenței hrănirii și/sau o sursă de hrană alternativă.

Selectarea concentrațiilor de testare

27. Informațiile anterioare cu privire la toxicitatea substanței chimice de testare, provenite, de exemplu, dintr-o serie de studii de stabilire a intervalului, ar trebui să faciliteze selectarea concentrațiilor de testare adecvate. Dacă este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu cinci concentrații ale substanței chimice de testare cuprinse între 0,1 și 1 000 mg/kg de sol uscat, cu cel puțin o probă duplicat pentru tratamente și pentru vasul de control. Durata testului de stabilire a intervalului este de 14 zile, după care se stabilesc rata mortalității în rândul acarienilor adulți și numărul de exemplare tinere. Intervalul concentrațiilor în cadrul testului final trebuie să fie ales de preferință astfel încât să includă concentrații care să influențeze numărul de exemplare tinere, însă nu și supraviețuirea generației materne. Cu toate acestea, acest lucru nu poate fi posibil în cazul substanțelor chimice care provoacă efecte letale și subletale în concentrații aproximativ similare. Concentrațiile efective (de exemplu, EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) și intervalul de concentrații în care efectul substanței de testare prezintă interes trebuie să fie cuprinse în seria concentrațiilor incluse în test. Extrapolarea la valori cu mult sub cea mai scăzută concentrație care afectează organismele de testare sau cu mult peste cea mai mare concentrație testată trebuie realizată numai în cazuri excepționale și trebuie furnizată o explicație completă în raport.

Proiectul experimentului

Teste doză-răspuns

28. Sunt propuse trei modele de teste, pe baza recomandărilor formulate în cadrul unui alt ring test [Testul de reproducere a enchitreidelor (22)].

▼M6

Caracterul adecvat general al tuturor acestor modele a fost confirmat de rezultatele validării privind *H. aculeifer*.

29. La stabilirea intervalului de concentrații, trebuie să se rețină următoarele:

— Pentru stabilirea valorii EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}), trebuie testate douăsprezece concentrații. Se recomandă cel puțin două probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și șase probe duplicat de control. Factorul de separare poate varia, putând fi mai mic sau egal cu 1,8 în gama de efecte prevăzută și mai mare de 1,8 la concentrații mai ridicate sau mai scăzute.

— Pentru stabilirea valorii NOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare și opt vase de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 2,0.

— O abordare combinată permite determinarea valorilor NOEC și EC_x. Trebuie utilizate opt concentrații de tratament într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru probe duplicat pentru fiecare tratament și opt vase de control. Concentrațiile trebuie să fie separate de un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

Test la valori-limită

30. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg greutate uscată a solului), testul de reproducere final poate fi realizat sub forma unui test la valori-limită utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg greutate uscată a solului. Un test la valori-limită va oferi posibilitatea de a demonstra că NOEC sau EC_{10} pentru reproducere este mai mare decât concentrația-limită, diminuând în același timp numărul acarienilor utilizați în cadrul testului. Trebuie utilizate opt probe duplicat atât pentru solul tratat, cât și pentru vasul de control.

Durata testului și măsurători

31. Trebuie înregistrată orice diferență observată între comportamentul și morfologia acarienilor din vasele de control și cele tratate.

32. În cea de a 14-a zi, acarienii supraviețuitori sunt extrași din sol prin extracție la căldură/lumină sau printr-o altă metodă corespunzătoare (a se vedea apendicele 5). Exemplarele tinere (și anume, larve, protonimfe și deutonimfe) și adulții sunt numărați separat. Toți acarienii adulți care nu sunt găsiți în acest stadiu sunt înregistrați ca morți, presupunându-se că respectivii acarieni au murit și s-au descompus înainte de evaluare. Eficiența extracției trebuie validată o dată sau de două ori pe an în vasele de control cu numere cunoscute de adulți și de exemplare tinere. Eficiența trebuie să fie mai mare de 90 % în medie combinată pentru toate stadiile de dezvoltare (a se vedea apendicele 5). Numărul de adulți și de exemplare tinere nu este ajustat în funcție de eficiență.

DATE ȘI RAPORT

Interpretarea rezultatelor

33. Informațiile privind metodele statistice care pot fi utilizate pentru analiza rezultatelor testelor sunt furnizate la punctele 36-41. În plus, trebuie consultat Documentul 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (31).

34. Principalul punct final de testare este rata de reproducere, în acest caz, numărul de exemplare tinere produse per vas de testare duplicat (cu 10 femele adulte incluse). Analiza statistică necesită calcularea mediei aritmetice (X) și a variației (s^2) pentru rata de reproducere pentru fiecare

▼M6

tratament și pentru fiecare vas de control. X și s^2 sunt utilizate pentru procedurile ANOVA precum testul t Student, testul Dunnett sau testul Williams, precum și pentru calcularea intervalelor de încredere la 95 %.

Notă: acest punct final principal este echivalent cu rata de reproducere măsurată ca numărul de exemplare tinere supraviețuitoare produse pe parcursul testului împărțit la numărul de femele părinți incluse la începutul testului.

35. Numărul de femele supraviețuitoare din vasele de control netratate reprezintă un criteriu de validitate important și trebuie documentat. Ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne nocive trebuie înregistrate și în raportul final.

ECx:

36. Valorile ECx, inclusiv limitele de încredere de 95 % inferioare și superioare corespunzătoare parametrului descris la punctul 34 se calculează utilizând metodele statistice adecvate (de exemplu, analiza probit, funcția logistică sau Weibull, metoda simplificată Spearman-Karber sau simpla interpolare). O valoare EC_x se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare cu x % din media etaloanelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC_{50} sau a unei alte valori EC_x, mediile per tratament (X) trebuie supuse unei analize de regresie.

NOEC/LOEC

37. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat duplicat). Trebuie utilizate metode statistice adecvate (conform Documentului 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”). În general, efectele adverse ale substanței de testare în raport cu proba de control sunt analizate cu ajutorul unei testări a ipotezei unilaterale (inferioare) la $p \leq 0,05$. Exemple sunt furnizate la punctele de mai jos.

38. Distribuția normală a datelor poate fi testată, de exemplu cu ajutorul testului de calitate a ajustării Kolmogorov-Smirnov, al testului raportului interval/deviație standard (testul R/s) sau al testului Shapiro-Wilk (bilateral, $p \leq 0,05$). Pentru testarea omogenității variației, poate fi utilizat testul Cochran, testul Levene sau testul Bartlett (bilateral, $p \leq 0,05$). În cazul în care sunt îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitatea variației), se pot efectua o analiză de variață (ANOVA) unilaterală și teste multicomparative ulterioare. Pot fi utilizate comparații multiple (de exemplu, testul Dunnett) sau teste regresive de stabilire a tendinței (testul Williams în cazul unui raport doză-răspuns monoton) pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ($p \leq 0,05$) între vasele de control și diversele concentrații ale substanței de testare (selectarea testului recomandat conform Documentului 54 al OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application”). În caz contrar, trebuie utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul U Bonferroni conform testului de Holm sau testului de stabilire a tendinței Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

Test la valori-limită

39. În cazul în care a fost efectuat un test la valori-limită (compararea probei de control cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), pot fi evaluate răspunsurile metrice prin intermediul testului Student (testul t). Se poate utiliza testul t pentru variațe (testul t Welch) sau un test neparametric, precum testul U Mann-Whitney, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe.

40. Pentru determinarea diferențelor semnificative între vasele de control (vasul de control și vasul de control cu solvent), probele duplicat ale fiecărui vas de control pot fi testate conform descrierilor pentru testul la valori-limită. În

▼M6

cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate probele duplicat ale vaselor de control și ale vaselor de control cu solvent pot fi cumulate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu vasul de control cu solvent.

Raportul de testare

41. Raportul de testare trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

— *Substanța chimică testată*

— identitatea substanței chimice de testare, denumirea, lotul și numărul CAS, puritatea;

— proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare [de exemplu, log K_{ow}, solubilitatea în apă, presiunea de vapori, constanta Henry (H) și, de preferință, informații privind evoluția substanței chimice de testare în sol).

— *Organismele de testare*

— identificarea și furnizorul organismelor de testare, descrierea condițiilor de creștere;

— intervalul de vârstă al organismelor de testare.

— *Condițiile de testare*

— descrierea modelului experimental și a procedurii;

— detalii privind pregătirea solului de testare; specificații detaliate în cazul în care se utilizează sol natural (origine, istoric, distribuția dimensiunii particulelor, pH-ul, conținutul de materie organică și, dacă este disponibilă, clasificarea solului)

— capacitatea maximă a solului de retenție a apei;

— o descriere a tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice de testare în sol;

— detalii privind substanțele chimice auxiliare utilizate pentru administrarea substanței chimice de testare;

— dimensiunea vaselor de testare și masa uscată de sol de testare pentru fiecare vas;

— condițiile de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;

— o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;

— pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și pe parcursul testului (probă de control și fiecare tratament)

— o descriere detaliată a metodei de extracție și eficiența extracției.

— *Rezultatele testului*

— numărul de exemplare tinere determinat în fiecare vas de testare la finalul testului;

— numărul de femele adulte și rata mortalității în rândul exemplarelor adulte (%) din fiecare vas de testare la finalul testului

— o descriere a simptomelor evidente sau schimbările clare de comportament;

— rezultatele obținute cu substanța chimică de testare de referință;

— rezumatul statisticilor (EC_x și/sau NOEC), inclusiv limitele de încredere de 95 % și o descriere a metodei de calcul;

▼**M6**

— un grafic al relației concentrație/răspuns;

— abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului.

BIBLIOGRAFIE

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. A 2-a ediție În: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popua-lation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). În: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haga, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Ind. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Ind. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. și Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. În: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. și Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. În: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. și Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. și Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. și Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (Organizația Internațională de Standardizare) (1994). Calitatea solului – Determinarea pH-ului, nr. 10390. ISO, Geneva.

▼**M6**

(15) Capitolul C.8 din prezenta anexă – Toxicitatea la râme.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. şi Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Capitolul C.32 din prezenta anexă – Testul de reproducere a enchitreidelor.

(23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. şi Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. şi Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes" in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. şi Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼**M6**

Apendicele 1

Definiții

Următoarele definiții se aplică prezentei metode de testare (în cadrul prezentului test toate concentrațiile cu efecte observate sunt exprimate ca masă a substanței chimice testate raportată la masa uscată a solului de testare):

„Substanța chimică” este o substanță sau un amestec.

„NOEC” (concentrația la care nu se observă niciun efect) reprezintă concentrația substanței chimice de testare în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul prezentului test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„LOEC” (concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect) reprezintă concentrația cea mai scăzută a substanței chimice de testare care prezintă un efect semnificativ ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu proba de control.

„ECx” (concentrația efectivă pentru un efect de x %) reprezintă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor de testare pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu o probă de control. De exemplu, o EC_{50} reprezintă o concentrație estimată care determină un efect asupra unui punct final de testare în cazul a 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere.

„Substanța chimică de testare” reprezintă orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

▼**M6**

Apendicele 2

Determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei este considerată a fi una adecvată. Aceasta este descrisă în anexa C din ISO DIS 11268-2 [Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction (23)].

Se prelevează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru îmbibată cu apă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până ce nivelul apei depășește nivelul solului. Acesta trebuie apoi ținut în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât apa absorbită de capilarele solului nu poate fi reținută în totalitate, aceasta trebuie lăsată să se evapore din proba de sol timp de două ore prin amplasarea tubului pe un pat de nisip cuarțos fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea acestuia). Proba trebuie apoi cântărită, uscată la o temperatură de 105 °C până ce atinge o masă constantă. Capacitatea de retenție a apei (WHC) poate fi apoi calculată după cum urmează:

$$\text{WHC(în \% din masa uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat în apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

▼**M6**

Apendicele 3

Determinarea pH-ului solului

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (16).

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie a solului (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ($CaCl_2$) 0,01 M de puritate analitică. Ulterior, suspensia este agitată bine timp de cinci minute și lăsată să se sedimenteze timp de cel puțin 2 ore, însă nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost calibrat înaintea fiecărei măsurători utilizând o serie corespunzătoare de soluții-tampon (de exemplu, pH 4,0 și 7,0).

▼M6

Apendicele 4

Creșterea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, a acarienilor utilizați ca hrană și sincronizarea culturilor

Creșterea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Culturile pot fi menținute în vase din plastic sau în borcane din sticlă umplute cu un amestec din ipsos de Paris și de pulbere de cărbune (9:1). Ipsosul poate fi menținut umed prin adăugarea a câtorva picături de apă distilată sau deionizată, dacă este necesar. Temperaturile de creștere optime sunt cuprinse între 20 ± 2 °C, regimul lumină/întuneric nu este relevant pentru această specie. Prada poate fi constituită din acarieni *Typrophagus putrescentiae* sau *Caloglyphus* sp. (acarienii utilizați ca hrană trebuie manipulați cu atenție întrucât ar putea provoca alergii la om), însă și nematodele, enchitreidele și colembolele sunt adecvate ca pradă. Sursa lor trebuie înregistrată. Dezvoltarea populației poate începe cu o singură femelă, deoarece masculii se dezvoltă în ouă nefecundate. Generațiile se suprapun într-o mare măsură. O femelă poate trăi cel puțin 100 de zile și poate depune aproximativ 100 de ouă pe parcursul întregii sale durate de viață. Nivelul maxim de pontă ovulară este atins între 10 și 40 de zile (după atingerea stadiului de adult) și se ridică la un număr de 2,2 ouă femelă$^{-1}$ zi^{-1}. Perioada de dezvoltare de la stadiul de ou la cel de femelă adultă este de aproximativ 20 de zile la o temperatură de 20 °C. Trebuie menținute și tratate mai multe culturi în prealabil.

Creșterea acarianului *Typrophagus putrescentiae:*

Acarienii sunt ținuți într-un vas de sticlă umplut cu drojdie fină de bere uscată, care este introdus într-o găleată din plastic umplută cu soluție de KNO_3 pentru a împiedica acarienii să scape. Acarienii utilizați pentru hrană sunt așezați deasupra acestui strat de drojdie urcată. Ulterior, cu ajutorul unei spatule, aceștia sunt amestecați atent cu drojdia (care trebuie înlocuită de două ori pe săptămână).

Sincronizarea culturilor:

Exemplarele utilizate în cadrul testului trebuie să aibă aceeași vârstă (aproximativ 7 zile după atingerea stadiului de adult). La o temperatură de creștere de 20 °C, sincronizarea se realizează astfel:

Se transferă femelele într-un vas de creștere curat și se adaugă suficientă hrană

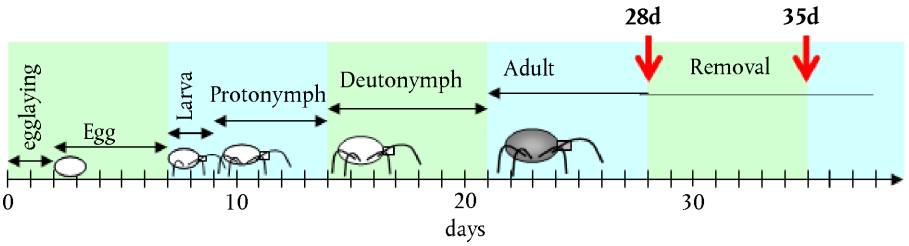
— Se lasă femelele să depună ouă timp de două-trei zile și apoi se scot din vas

— Se prelevează femelele adulte pentru testare între cea de a 28-a și a 35-a zi după introducerea femelelor adulte în vase de creștere curate.

Femelele adulte pot fi ușor diferențiate de masculi și de cele aflate în alte stadii de dezvoltare prin dimensiunea lor mai mare, prin forma umflată și prin scutul dorsal de culoare maro (masculii sunt mai subțiri și plați), iar acarienii imaturi au o culoare alb-crem. Dezvoltarea acarienilor urmează aproximativ același tipar descris mai jos la o temperatură de 20 °C (figura): ou 5 zile, larvă 2 zile, protonimfă 5 zile, deutonimfă 7 zile, perioada anterioară pontei ovulare a femelei 2 zile. Apoi, acarienii devin adulți.

Figură

Dezvoltarea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* la o temperatură de 20 °C. (extracție = femele utilizate pentru test)



▼**M6**

Animalele adulte pentru testare sunt extrase din cultura sincronizată și introduse în vasele de testare între cea de a 28-a zi și cea de a 35-a zi după începerea perioadei de pontă a femelelor părinți (și anume, 7-14 zile după trecerea la stadiul de adult). Aceasta garantează faptul că animalele pentru testare au trecut deja de perioada anterioară pontei ovulare și s-au împerecheat cu masculii prezenți, de asemenea, în vasul de cultură. Observațiile efectuate pe culturile de laborator sugerează că, dacă masculii sunt prezenți, femelele se împerechează imediat sau la scurt timp după trecerea în stadiul de adult (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). Perioada de șapte zile este aleasă pentru a facilita integrarea în rutina de laborator și pentru a atenua variabilitatea de dezvoltare individuală în rândul acarienilor. Ponta ovulară trebuie inițiată cu un număr de femele cel puțin egal cu cel care va fi în final necesar pentru test (Dacă, de exemplu, sunt necesare 400 de femele în cadrul testului, cel puțin 400 de femele trebuie lăsate să depună ouă timp de două-trei zile. Cel puțin 1 200 de ouă trebuie să reprezinte punctul de pornire pentru populația sincronizată (proporția relativă a sexelor fiind de aproximativ 0,5, rata mortalității, de aproximativ 0,2). Pentru a se evita canibalismul, este de preferat să nu se introducă într-un vas mai mult de 20-30 de femele aflate în perioada de pontă ovulară.

▼**M6**

Apendicele 5

Metode de extracție

În cazul microartropodelor, o extracție la căldură reprezintă o metodă adecvată pentru separarea exemplarelor de sol/substrat (a se vedea figura de mai jos). Metoda se bazează pe activitatea organismelor, astfel că doar exemplarele mobile vor avea șansa de a fi înregistrate. Principiul extracției la căldură constă în degradarea progresivă a condițiilor pentru organismele din eșantion, astfel încât acestea vor părăsi substratul și vor cădea într-un lichid de fixare (de exemplu, etanol). Punctele esențiale sunt durata extracției și variația condițiilor pentru organisme de la bune la moderate și precare. Durata extracției pentru testele ecotoxicologice trebuie să fie cât mai scurtă posibil, deoarece orice creștere a populației pe parcursul perioadei de extracție ar vicia rezultatele. Pe de altă parte, condițiile de temperatură și de umiditate din eșantion trebuie să se încadreze întotdeauna într-un interval care să permită deplasarea acarienilor. Încălzirea unui eșantion de sol conduce la o deshidratare a substratului. Dacă deshidratarea este prea rapidă, anumiți acarieni ar putea să se deshidrateze la rândul lor înainte de a reuși să scape.

Prin urmare, este propusă următoarea procedură (24) (25):

Aparatură: pâlnie Tullgren sau metode comparabile precum, de exemplu, metoda McFadyen (încălzire pe deasupra, eșantionul este așezat pe o pâlnie)

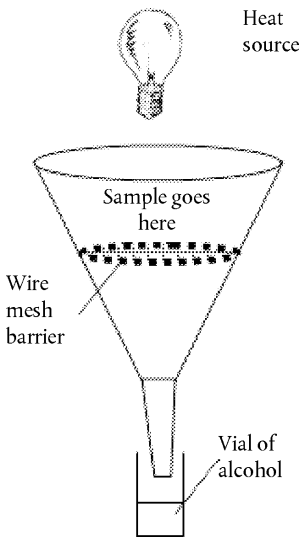
Regimul de încălzire: 25 °C timp de 12 ore, 35 °C timp de 12 ore, 45 °C timp de 24 de ore (în total 48 de ore). Temperatura trebuie măsurată în substrat.

Lichidul de fixare: etanol la 70 %

Detalii: Luați flaconul din sticlă care a fost utilizat pentru test. Scoateți capacul și înfășurați gura flaconului cu o bucată de plasă sau de țesătură. Țesătura trebuie să aibă o dimensiune a ochiurilor cuprinsă între 1,0 și 1,5 mm. Fixați țesătura cu o bandă elastică. Răsturnați cu atenție flaconul și așezați-l în aparatul de extracție. Țesătura împiedică substratul să se scurgă în lichidul de fixare, însă permite acarienilor să iasă din eșantion. Începeți procesul de încălzire după introducerea tuturor flacoanelor. Încheiați extracția după 48 de ore. Îndepărtați flacoanele de fixare și numărați acarienii cu ajutorul unui microscop de disecție.

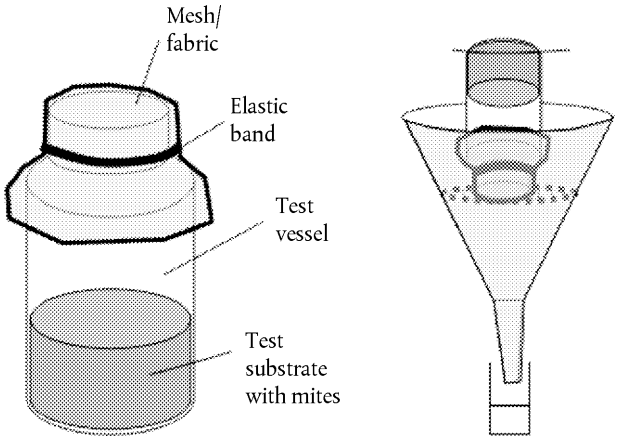
Eficiența de extracție a metodei alese trebuie să fi fost demonstrată o dată sau de două ori pe an cu ajutorul unor vase care conțin un număr cunoscut de exemplare tinere și de acarieni adulți crescuți într-un substrat de testare netratat. Eficiența trebuie să fie ≥ 90 % în medie combinată pentru toate stadiile de dezvoltare.

Dispozitivul de extracție de tip Tullgren



▼**M6**

Modul de pregătire a flaconului de testare după finalizarea testului, înainte de extracție



▼**M6**

Apendicele 6

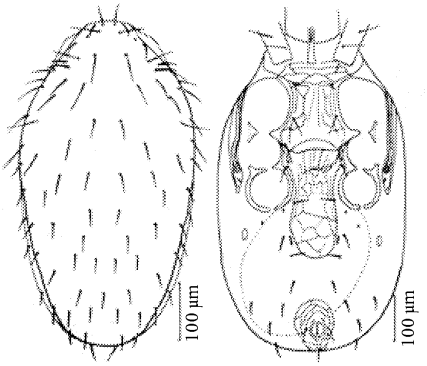
Identificarea acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Subclasă/ordin/subordin:	Familia:	Genul/subgenul/specia:
Acarieni/Parazitiforme/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

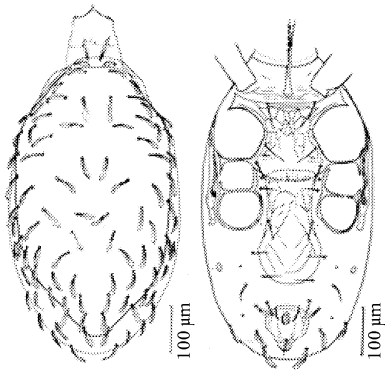
Autorul și data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 ianuarie 2007

Bibliografie	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, a 2-a ediție revizuită: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

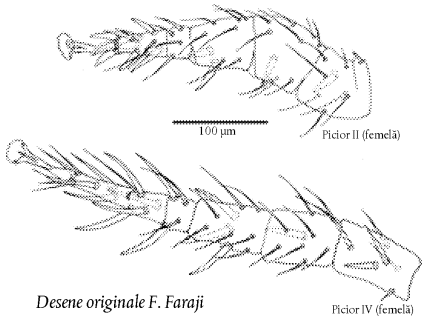
Caracteristici de determinare:	Înveliș cu marginea denticulată rotunjită; caneluri hipostomatice cu mai mult de 6 denticule; peri dorsali caudali Z4 nu foarte lungi; peri dorsali setiformi; scut genital normal, nu foarte dezvoltat și care nu atinge scutul anal; partea posterioară a scutului dorsal fără peri nepereche; picioarele II și IV cu câțiva peri mari și groși; păr dorsal Z5 de aproape două ori mai lung decât J5; deget fix de chelicer cu 12-14 dinți și deget mobil cu 2 dinți; Idiosoma 520-685 µm lungime. *Hypoaspis miles* este utilizat și în controlul biologic și poate fi confundat cu *H. aculeifer*. Principala diferență este: *H. miles* aparține subgenului *Cosmolaelaps* și are peri dorsali sub formă de lamă în timp ce *H. aculeifer* aparține subgenului *Geolaelaps* așa are peri dorsali setiformi.



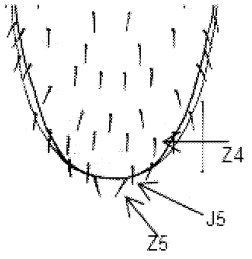
Hypoaspis aculeifer După Hughes, 1976



Hypoaspis miles Dupa Hughes, 1976



Desene originale F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
scut dorsal cu peri setiformi caracteristici

▼**M6**

Apendicele 7

Informații de bază privind biologia acarianului *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer aparține familiei *Lealapidae*, ordinul Acari (acarieni), clasa Arahnide, încrengătura *Arthropoda*. Aceștia trăiesc în toate tipurile de sol și se hrănesc cu alți acarieni, nematode, enchitreide și colembole (26). În lipsă de hrană, aceștia devin canibali (27). Acarienii prădători sunt segmentați în *Idiosoma* și *Gnathosoma*. Nu există o diferențiere clară între *Idiosoma* din *Prosoma* (cap) și *Opisthosoma* (abdomen). *Gnathosoma* (scutul de pe cap) conține instrumentele de hrănire precum pedipalpi și chelicere. Chelicerele sunt trifurcate și prevăzute cu dinți de diferite forme. În afară de ingestie, masculii își folosesc chelicerele în principal pentru transferul spermatoforelor la femele. Idiosoma este acoperită aproape în totalitate de un scut dorsal. O mare parte din idiosoma femelei este ocupată de organele de reproducere care se pot distinge în special cu puțin timp înainte de pontă. Pe partea ventrală, se găsesc două scuturi, scutul sternal și scutul genital. Toate picioarele sunt prevăzute cu țepi și gheare. Țepii sunt folosiți pentru ancorare în timpul deplasării în sol și pe sol. Prima pereche de picioare este utilizată în principal ca antenă. A doua pereche de picioare este utilizată nu numai pentru deplasare, ci și pentru imobilizarea prăzii. Ghearele de la cea de a patra pereche de picioare pot servi ca protecție, precum și ca „motor de deplasare” (28). Masculii au o lungime cuprinsă între 0,55 și 0,65 mm și o greutate cuprinsă între 10 și 15 µg. Femelele au o lungime cuprinsă între 0,8 și 0,9 mm și o greutate cuprinsă între 50 și 60 µg (8) (28) (Fig. 1).

Figura 1

Femelă, mascul, protonimfă și larvă de *H. aculeifer*.



La o temperatură de 23 °C, acarienii devin maturi din punct de vedere sexual după 16 zile (femelele) și, respectiv, după 18 zile (masculii) (6). Femelele transportă spermatozoizii prin solenostom de unde vor fi transferați în ovar. În ovar, spermatozoizii trec printr-un proces de maturizare și vor fi stocați. Fertilizarea are loc numai după maturizarea spermatozoizilor în ovar. Ovulele fecundate sau nefecundate vor fi depuse de femele în grămadă sau separat, de preferință în crăpături sau orificii. Femelele care s-au împerecheat pot purta exemplare de ambele sexe, în timp ce ouăle de la femelele care nu s-au împerecheat pot produce doar masculi. Pe parcursul dezvoltării până la stadiul de adult, acarienii traversează patru stadii de dezvoltare (ou – larvă, larvă – protonimfă, protonimfă – deutonimfă, deutonimfă – adult).

Oul este alb lăptos, hialin și eliptic, are o lungime de aproximativ 0,37 mm și o coajă tare. Conform celor menționate în referința (8), larvele au o dimensiune cuprinsă între 0,42 și 0,45 mm. Acestea au doar trei perechi de picioare. În regiunea capului, se dezvoltă pedipalpi și chelicere. Chelicerele, prevăzute cu câțiva dinți mici, sunt folosite pentru eclozare. La ieșirea din cocon, după 1-2 zile de la eclozare, se dezvoltă protonimfele. Acestea sunt, de asemenea, albe, au

▼**M6**

o dimensiune cuprinsă între 0,45 și 0,62 mm (8) și patru perechi de picioare. Chelicerele sunt în întregime acoperite cu dinți. Din acest stadiu, acarienii încep să își caute hrana. Din acest motiv, cuticula prăzii este străpunsă cu chelicerele și este eliberată în pradă o secreție care permite digestia extraintestinală. Amestecul de hrană poate fi apoi absorbit de către acarian. Chelicerele pot fi utilizate și la sfâșierea bucăților de hrană pentru a extrage din acestea particulele mai mari (28). Deutonimfele se dezvoltă după îndepărtarea unui alt strat al oului. Acestea au o dimensiune cuprinsă între 0,60 și 0,80 mm (8) și au o culoare galbenă spre maro deschis. Din acest stadiu, acestea pot fi separate în femele și masculi. În următoarea fază de eclozare, timp în care animalele sunt inactive și se dezvoltă scutul de culoare maro (după aproximativ 14 zile), acarienii ating stadiul de adulți (28) (29) (30). Ciclul lor de viață este cuprins între 48 și 100 de zile la o temperatură de 25 °C (27).

▼M6

Apendicele 8

Rezumatul și calendarul principalelor măsuri care trebuie luate pentru efectuarea testului pe *hypoaspis*

Timp (zile) începutul testului = ziua 0	Activitate/sarcină
Ziua – 35 până la – 28	Transferul femelelor din cultura stoc în vase curate pentru inițierea sincronizării 2 zile mai târziu: extracția femelelor de două-trei ori pe săptămână: furnizarea unei cantități suficiente de hrană
Ziua – 5 (+/– 2)	Pregătirea solului artificial
Ziua – 4 (+/– 2)	Determinarea capacității solului artificial de retenție a apei Uscare peste noapte Ziua următoare: cântărirea probelor și calcularea capacității de retenție a apei
Ziua – 4 (+/– 2)	Umezirea în prealabil a solului artificial pentru a atinge 20 – 30 % din capacitatea de retenție a apei
Ziua 0	Începerea testului: adăugarea substanței chimice de testare în solul artificial Introducerea a 10 femele în fiecare vas duplicat Cântărirea fiecărei probe duplicat Pregătirea de probe de control abiotice pentru măsurarea gradului de umezeală și a pH-ului, 2 probe duplicat pentru fiecare tratament Uscarea peste noapte a probelor de control Ziua următoare: cântărirea probelor de control pentru determinarea umidității Ziua următoare: măsurarea pH-ului din probele de control abiotice uscate
Ziua 3, 6, 9, 12 (aproximativ)	Adăugarea în fiecare duplicat a unei cantități suficiente de pradă Cântărirea fiecărei probe duplicat și,eventual, adăugarea unei cantități de apă echivalente cu cea evaporată
Ziua 14	Încheierea testului, efectuarea extracției din toate probele duplicat și din probele de control pentru verificarea eficienței extracției Uscarea peste noapte a probelor de control care conțin apă Ziua următoare: cântărirea probelor de control care conțin apă Ziua următoare: măsurarea pH-ului din probele de control uscate
Ziua 16	Finalizarea extracției
Ziua 16 +	Înregistrarea numărului de adulți și de exemplare tinere din materialul extras Raportarea rezultatelor în tabele-tip Raportarea procedurii de testare în fișele pentru protocoalele de testare.

▼M6

C.37. TEST DE 21 DE ZILE PE PEȘTI: SCREENING CU DURATĂ SCURTĂ PENTRU DETECTAREA ACTIVITĂȚII ESTROGENICE ȘI ANDROGENICE ȘI A INHIBĂRII AROMATAZEI

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea de testare (*test guideline* – TG) nr. 230 a OCDE (2009). Necesitatea dezvoltării și validării unui test pe pești capabil să detecteze anumite substanțe chimice active endocrin își are originea în îngrijorările cu privire la faptul că anumite niveluri de substanțe chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât oamenilor, cât și faunei sălbatice, din cauza interacțiunii respectivelor substanțe chimice cu sistemul endocrin. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări pentru screeningul și testarea unor potențiali perturbatori endocrini. Un element al activității a constat în elaborarea unei orientări de testare pentru screeningul substanțelor chimice active asupra sistemului endocrin al unor specii de pești. Testul de screening endocrin de 21 de zile la pești a făcut obiectul unui amplu program de validare constând în studii interlaboratoare cu substanțe chimice selectate pentru a demonstra relevanța și fiabilitatea testului de detectare a substanțelor chimice estrogenice și inhibitoare ale aromatazei (1, 2, 3, 4, 5) la cele trei specii de pești investigate (*Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* și peștele-zebră); detectarea activității androgenice este posibilă la *Pimephales promelas* și *Oryzias latipes*, dar nu la peștele-zebră. Această metodă de testare nu permite detectarea substanțelor chimice cu efecte antiandrogenice. Activitatea de validare a fost revizuită *inter pares* de către un grup de experți desemnați de coordonatorii naționali ai programului privind orientarea de testare (6). Testul nu este conceput pentru a identifica mecanismele specifice ale perturbărilor hormonale deoarece animalele testate au axul hipotalamo-hipofizo-gonadal (*hypothalamic-pituitary-gonadal* – HPG) intact, care poate reacționa la substanțele chimice care au efecte asupra axului HPG la diferite niveluri. Testul de reproducere cu durată scurtă pe pești (TG 229 a OCDE) include fertilitatea și, dacă este cazul, histopatologia gonadală a *Pimephales promelas*, precum și toți parametri studiați incluși în această metodă de testare. TG 229 a OCDE descrie screeningul substanțelor chimice care afectează reproducerea prin diferite mecanisme, inclusiv endocrine. Acesta fapt ar trebui luat în considerare înainte de selectarea celei mai adecvate metode de testare.

2. Această metodă de testare descrie un test de screening *in vivo* în cadrul căruia pești masculi maturi din punct de vedere sexual și pești femele ovulante sunt ținuți împreună și expuși la o substanță chimică pe parcursul unei durate limitate a ciclului lor de viață (21 de zile). La finalul perioadei de expunere de 21 de zile, în funcție de specia testată, se măsoară unul sau doi biomarkeri cu rol de parametru, la masculi și la femele, ca indicatori ai efectelor estrogenice, de inhibare a aromatazei sau androgenice ale substanței chimice testate; acești parametri sunt vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare. Vitelogenina se măsoară la *Pimephales promelas*, la *Oryzias latipes* și la peștele-zebră, în timp ce caracteristicile sexuale secundare se măsoară doar la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes*.

3. Acest test biologic servește drept test de screening *in vivo* pentru anumite moduri endocrine de acțiune, iar aplicarea sa ar trebui considerată în contextul „Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini” (28).

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

4. Vitelogenina este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la circulația estrogenului endogen. Ea este un precursor al proteinelor din vitellus și, după ce este produsă în ficat, circulă prin sânge la ovar, unde este absorbită și modificată de ouăle în dezvoltare. Vitelogenina este aproape nedetectabilă în plasma peștilor imaturi, femele și masculi, deoarece nu au suficient estrogen circulant; cu toate acestea, ficatul are capacitatea de a sintetiza și de a secreta vitelogenină ca răspuns la o stimulare estrogenică exogenă.

▼M6

5. Măsurarea vitelogeninei servește la detectarea substanțelor chimice cu diferite moduri estrogenice de acțiune. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției vitelogeninei la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter pares* [ex. (7)]. Inducția vitelogeninei a fost demonstrată și în urma expunerii la androgeni aromatizabili (8, 9). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17β-estradiol, determină o reducere a nivelului de vitelogenină, care se utilizează pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei (10, 11). Relevanța biologică a răspunsului vitelogeninei ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este bine stabilită și a fost amplu documentată. Cu toate acestea, este posibil ca producția de vitelogenină la femele să fie afectată și de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine, de exemplu de hepatotoxicitate.

6. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate cu succes și standardizate pentru utilizarea de rutină. Acesta este cazul metodelor cu specificitate de specie utilizând testul de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), în care se utilizează imunochimia pentru a cuantifica vitelogenina produsă în probe mici de sânge sau hepatice prelevate de la pești individuali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Pentru măsurarea vitelogeninei, de la *Pimephales promelas*se prelevează probe de sânge, de la peștele-zebră se prelevează probe de sânge sau omogenat din cap/coadă, iar de la *Oryzias latipes* se prelevează probe hepatice. În cazul *Oryzias latipes*, există o bună corelație între vitelogenina măsurată în sânge și cea măsurată în ficat (19). În apendicele 6 sunt descrise procedurile recomandate pentru prelevările efectuate în scopul măsurării vitelogeninei. Seturile pentru măsurarea vitelogeninei sunt disponibile pe scară largă; respectivele seturi trebuie să fie bazate pe o metodă ELISA validată, cu specificitate de specie.

7. Caracteristicile sexuale secundare ale peștilor masculi de anumite specii sunt vizibile la exterior, cuantificabile și sensibile la nivelurile de androgeni endogeni circulanți; acesta este cazul pentru *Pimephales promelas* și *Oryzias latipes* – însă nu și pentru peștele-zebră, care nu are caracteristici sexuale secundare cuantificabile. Femelele își păstrează capacitatea de a dezvolta caracteristici sexuale secundare masculine atunci când sunt expuse la substanțe chimice androgenice din apă. În literatura de specialitate există mai multe studii pentru a documenta acest tip de răspuns în cazul *Pimephales promelas* (20) și al *Oryzias latipes* (21). O atenuare a caracteristicilor sexuale secundare ale masculilor ar trebui interpretată cu prudență din cauza puterii statistice mici și ar trebui să fie bazată pe opiniile experților și pe greutatea dovezilor. Există limitări în ceea ce privește utilizarea peștelui-zebră în acest test din cauza absenței caracteristicilor sexuale secundare cuantificabile sensibile la substanțe chimice cu efecte androgenice.

8. În cazul *Pimephales promelas*, principalul indicator al expunerii la androgeni exogeni este numărul de tuberculi nupțiali situați pe botul femelei. În cazul femelelor de *Oryzias latipes*, numărul de procese papilare constituie principalul indicator al expunerii exogene la substanțe chimice cu efecte androgenice. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale ale *Pimephales promelas* și, respectiv, ale *Oryzias latipes* sunt indicate în apendicele 5A și în apendicele 5B.

9. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

10. În cadrul testului, masculii și femelele aflați în stadiu de reproducere sunt expuși împreună în vase de testare. Stadiul de adult și cel reproducător al acestora permite o diferențiere clară a fiecărui sex și, în consecință, o analiză a fiecărui parametru în funcție de sex, și asigură sensibilitatea lor la substanțe chimice exogene. La finalul testului, sexul este confirmat

▼M6

printr-o examinare macroscopică a gonadelor după incizia ventrală a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci. O prezentare generală a condițiilor de biotestare relevante este redată în apendicele 2. Testul se efectuează în mod normal pe pești selectați dintr-o populație capabilă să elibereze gameți; nu trebuie utilizate animale senescente. Orientarea privind vârsta peștilor și stadiul de reproducere al acestora este inclusă în secțiunea privind selectarea speciei de pește. Testul este realizat utilizând trei concentrații de expunere la substanțe chimice, precum și un vas de control cu apă și un vas de control cu solvent, dacă este necesar. Pentru fiecare tratament se utilizează două vase sau vase duplicat (fiecare vas conținând 5 masculi și 5 femele) în cazul *Oryzias latipes* și al peștelui-zebră și patru vase sau vase duplicat (fiecare vas conținând 2 masculi și 4 femele) în cazul *Pimephales promelas*. Acest principiu permite acomodarea comportamentului teritorial al masculului de *Pimephales promelas* menținând în aceleași timp o putere suficientă a testului. Expunerea se realizează timp de 21 de zile, iar prelevarea de probe de la pești se efectuează în cea de a 21 zi de expunere.

11. După prelevarea de probe în cea de a 21-a zi, toate animalele sunt eutanasiate. Caracteristicile sexuale secundare se măsoară în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes* (a se vedea apendicele 5A și apendicele 5B); se prelevează probe de sânge pentru determinarea vitelogeninei de la peștele-zebră și de la *Pimephales promelas*, ca alternativă putându-se preleva probe de la cap/coadă pentru determinarea vitelogeninei la peștele-zebră (apendicele 6); pentru măsurarea VTG în cazul *Oryzias latipes* se prelevează probe din ficat (apendicele 6).

CRITERII DE ACCEPTARE A TESTULUI

12. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— mortalitatea din vasele de control cu apă (sau cu solvent) nu trebuie să depășească 10 % la încheierea perioadei de expunere;

— concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe parcursul întregii perioade de expunere de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între vasele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută într-un interval de 2 °C în limitele de temperatură specificate pentru speciile testate (apendicele 2);

— trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare în soluție a concentrațiilor substanței chimice utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

13. Echipamentul obișnuit de laborator și în special următoarele:

(a) pH-metru și aparat de măsurare a oxigenului;

(b) echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

(c) aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;

(d) bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și densitatea populației recomandate (a se vedea apendicele 2);

(e) substrat de reproducere pentru *Pimephales promelas* și peștele-zebră, apendicele 4 conține detaliile necesare;

(f) balanță cu precizie adecvată (adică precizie de ± 0,5 mg).

▼M6

Apă

14. În cadrul testului poate fi utilizat orice tip de apă în care specia testată supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată corespunzătoare. Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Trebuie să aibă un pH cuprins în intervalul 6,5 – 8,5, dar pe durata unui test pH-ul trebuie să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități. Pentru a garanta faptul că apa de diluție nu influențează în mod negativ rezultatul testului (de exemplu prin formarea de complexe ale substanței chimice utilizate în testare) trebuie prelevate periodic probe pentru analiză. De exemplu, la fiecare trei luni trebuie măsurate metale grele (ex., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), anioni și cationi majori (ex., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} și SO_4^{2-}), pesticide (ex., organofosforice totale și organoclorurate totale), carbon organic total și solide în suspensie în cazul în care apa de diluție este cunoscută ca având calitate constantă. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe parcursul unei perioade de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni). Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 3.

Soluții de testare

15. Soluțiile de testare în concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testare în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot utiliza coloane de saturare (coloane de solubilitate). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație ca cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, un solvent poate constitui cea mai bună soluție din punct de vedere tehnic; trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (22). Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice. Documentul de orientare al OCDE recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100µl/l. Cu toate acestea, o analiză recentă (23) a evidențiat îngrijorări suplimentare generate de utilizarea solvenților pentru testarea activității endocrine. Prin urmare, se recomandă reducerea la minimum concentrației solventului, dacă este necesar și dacă este posibil din punct de vedere tehnic (în funcție de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice utilizate în testare).

16. Va fi utilizat un sistem de testare cu flux continuu. Un astfel de sistem alimentează și diluează continuu o soluție stoc conținând substanța chimică utilizată în testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturare) pentru a furniza o serie de concentrații în incintele de testare. Debitele soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic, de preferință zilnic, pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Trebuie evitată utilizarea unor tuburi din plastic de calitate inferioară sau a altor materiale care pot conține substanțe biologic active. În momentul selectării materialului pentru sistemul de testare cu flux continuu trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței de testare de către respectivul material.

Alegerea peștilor

17. Peștii de testare trebuie selectați dintr-o populație de laborator, de preferință dintr-un singur stoc, care a fost aclimatizată timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare celor utilizate în test. Este important ca rata de încărcare și densitatea populației (pentru definiții, a se vedea apendicele 1) să fie adecvate pentru speciile utilizate în cadrul testului (a se vedea apendicele 2).

18. După o perioadă de aclimatizare de 48 de ore, se înregistrează mortalitățile și se aplică următoarele criterii:

▼M6

— mortalități mai mari de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;

— mortalități între 5 % și 10 % din populație: aclimatizare timp de alte șapte zile; dacă mortalitatea este mai mare de 5 % în timpul celei de a doua perioade de șapte zile, întregul lot se respinge;

— mortalități mai mici de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă întregul lot

19. Peștii nu trebuie tratați de boli pe parcursul perioadei de aclimatizare, în perioada de preexpunere sau pe parcursul perioadei de expunere.

Preexpunerea și selectarea peștilor

20. Se recomandă o perioadă de preexpunere de o săptămână pe parcursul căreia animalele sunt introduse în vase similare cu cele utilizate în cadrul testului propriu-zis. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* pe parcursul întregii perioade de reținere și în faza de expunere. Faza de expunere începe cu pești adulți dimorfici din punct de vedere sexual selectați dintr-o populație de animale de laborator mature din punct de vedere reproductiv (de exemplu, prezentând caracteristici sexuale secundare clare, vizibile în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes*) și care eliberează activ gameți. Exclusiv pentru o orientare generală (și fără ca acest fapt să fie luat în considerare independent de observarea stadiului efectiv de reproducere al unui anumit lot de pești), *Pimephales promelas* trebuie să aibă aproximativ 20 (± 2) de săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. *Oryzias latipes* trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25 ± 2 C pe parcursul întregii lor vieți. Peștii-zebră trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 26 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți.

PROTOCOLUL TESTULUI

21. Se utilizează trei concentrații ale substanței chimice de testare, un vas de control (apă) și, dacă este necesar, un vas de control cu solvent. Datele pot fi analizate pentru a determina diferențele semnificative din punct de vedere statistic dintre răspunsurile corespunzătoare tratamentului și vaselor de control. Aceste analize vor oferi informații cu privire la necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe termen mai lung pentru a se detecta posibile efecte adverse (și anume, asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) ale substanței chimice, în loc de a fi utilizate în cadrul evaluării riscurilor (24).

22. În cazul peștelui-zebră și al *Oryzias latipes*, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculi și femele pentru fiecare nivel de tratament (5 masculi și 5 femele din fiecare dintre cele două vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare, după caz. În cazul *Pimephales promelas*, în cea de a 21-a zi de expunere, sunt prelevate probe de la masculi și femele (2 masculi și 4 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare.

Selectarea concentrațiilor de testare

23. În scopurile acestui test, cea mai mare concentrație de testare trebuie stabilită fie la concentrația maximă tolerată (CMT) obținută cu ajutorul unei metode de determinare a intervalului sau din alte date privind toxicitatea, fie la valoarea de 10 mg/l, fie la valoarea corespunzătoare solubilității maxime în apă, oricare este cea mai mică. CMT este definită ca fiind cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice având ca rezultat o rată a mortalității mai mică de 10 %. Utilizarea acestei metode presupune existența unor date empirice privind toxicitatea acută sau a altor date privind toxicitatea pe baza cărora poate fi estimată CMT. Estimarea CMT poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită analiză profesională.

▼M6

24. Sunt necesare trei concentrații de testare, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește valoarea 10, și un control cu apă de diluție (și un control cu solvent, dacă este necesar). Se recomandă ca factorii de diferențiere să se încadreze în intervalul 3,2 și 10.

PROCEDURA

Selectarea și cântărirea peștilor pentru testare

25. Este important ca diferențele de greutate a peștilor să fie reduse la minimum la începutul testului. În apendicele 2 sunt prezentate intervalele recomandate de mărime corespunzătoare diferitelor specii pentru acest test. Pentru întregul lot de pești utilizați în cadrul testului, intervalul greutăților individuale ale masculilor și femelelor la începutul testului trebuie menținut, dacă este posibil, în limite de ± 20 % din media aritmetică a greutății fiecărui sex. Se recomandă cântărirea unui subeșantion din stocul de pești înainte de testare pentru a estima greutatea medie.

Condiții de expunere

Durată

26. Durata testului este de 21 de zile după o perioadă de preexpunere. Perioada de preexpunere recomandată este de o săptămână.

Hrănirea

27. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* cu hrană corespunzătoare (apendicele 2) într-o cantitate suficientă pentru menținerea condiției fizice. Trebuie evitată proliferarea microbilor și apariția turbidității apei. Ca orientare generală, rația zilnică poate fi împărțită în două sau trei porții egale administrate de mai multe ori pe zi, la intervale de cel puțin trei ore. Se acceptă o singură rație mai mare în special în weekenduri. Peștii nu trebuie hrăniți timp de 12 ore înainte de prelevarea probelor/necropsie.

28. Hrana peștilor trebuie evaluată pentru a detecta contaminanți precum pesticide organoclorurate, hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili policloruraţi (BPC). Trebuie evitate alimente cu un nivel înalt de fitoestrogeni care ar compromite răspunsul în cadrul testului la un agonist de estrogen cunoscut (de exemplu, 17-beta estradiol).

29. Hrana neconsumată și materiile fecale trebuie înlăturate din vasele de testare cel puțin de două ori pe săptămână, de exemplu prin curățarea cu grijă a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon.

Lumina și temperatura

30. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2).

Frecvența determinărilor și măsurătorilor analitice

31. Înainte de începerea perioadei de expunere, trebuie asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Trebuie stabilite toate metodele analitice necesare, incluzând cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în sistemul de testare. Pe parcursul testului, concentrațiile substanței chimice de testare sunt determinate la intervale regulate, astfel: debitul diluantului și cel al soluției stoc toxice trebuie verificate, de preferat zilnic, însă de cel puțin două ori pe săptămână, iar aceste fluxuri nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului. Se recomandă măsurarea concentrațiilor efective ale substanței chimice de testare în toate vasele la începutul testului și, ulterior, săptămânal.

32. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrațiile măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței chimice de testare în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de ±20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi fundamentate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.

33. Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45μm) sau centrifugarea lor. Dacă este necesară, procedura recomandată este centrifugarea. Cu toate acestea, dacă materialul de testare nu se absoarbe în filtre, filtrarea este de asemenea acceptabilă.

▼M6

34. Pe parcursul testului, oxigenul dizolvat, temperatura și pH-ul trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână. Duritatea și alcalinitatea totale trebuie măsurate cel puțin o dată pe săptămână în vasele de control și în vasul cu cea mai înaltă concentrație. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul dintre vasele de testare.

Observații

35. O serie de răspunsuri biologice generale (de exemplu, supraviețuirea) și esențiale (de exemplu, nivelurile de vitelogenină) sunt evaluate pe parcursul testului sau la încheierea acestuia. Măsurarea și evaluarea acestor parametri și utilitatea lor sunt descrise în continuare.

Supraviețuire

36. Peștii trebuie examinați zilnic pe parcursul perioadei de testare și orice caz de deces trebuie înregistrat, iar peștii morți trebuie îndepărtați cât mai rapid posibil. Peștii morți nu trebuie înlocuiți în vasele de control sau în vasele de tratament. Sexul peștilor morți în timpul testului trebuie stabilit printr-o evaluare macroscopică a gonadelor.

Comportament și aspect

37. Trebuie notat orice comportament anormal (în raport cu grupul de control); acesta ar putea include semne ale toxicității generale, inclusiv hiperventilația, înotul necoordonat, pierderea echilibrului, imobilitate sau hrănire atipice. În plus, trebuie observate anomaliile externe (precum hemoragia, modificările de culoare). Astfel de semne de toxicitate trebuie luate în considerare cu atenție în timpul interpretării datelor, deoarece ele pot indica concentrații la care biomarkerii activității endocrine nu sunt fiabili. Aceste observații referitoare la comportament pot furniza, de asemenea, informații calitative utile pentru potențialele viitoare cerințe în materie de testare a peștilor. De exemplu, a fost observată o agresivitate teritorială la masculii normali sau la femele masculinizate de *Pimephales promelas* prin expunere la androgenice; în cazul peștelui-zebră, comportamentul caracteristic de împerechere și de eliberare de gameți după răsăritul soarelui este redus sau stânjenit de expunerea la estrogenice sau la antiandrogenice.

38. Deoarece anumite elemente legate de aspect (în primul rând culoarea) se pot modifica rapid în timpul manipulării, este important să se realizeze observații calitative înainte de eliminarea animalelor din sistemul de testare. Experiența de până în prezent în ceea ce privește *Pimephales promelas* sugerează că anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce inițial modificări ale următoarelor caracteristici exterioare: culoarea corpului (deschisă sau închisă), modele de colorație (prezența unor dungi verticale) și forma corpului (regiunea capului și regiunea pectorală). Prin urmare, trebuie realizate observații privind aspectul fizic al peștilor pe parcursul testului și la încheierea studiului.

Eutanasierea peștilor

39. În ziua 21, adică la încheierea perioadei de expunere, peștii trebuie eutanasiați cu ajutorul unor cantități corespunzătoare de tricaină [metan sulfonat de tricaină, metacaină, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l, tamponată cu 300 mg/l $NaHCO_3$ (bicarbonat de sodiu, CAS 144-55-8) pentru a reduce iritația mucoaselor; apoi sunt prelevate probe de sânge sau de țesut pentru determinarea vitelogeninei, conform explicațiilor din secțiunea privind vitelogenina.

▼M6

Observarea caracteristicilor sexuale secundare

40. Anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce modificări ale caracteristicilor sexuale secundare specializate (numărul de tuberculi nupțiali la masculul de *Pimephales promelas*, procesele papilare la masculul de *Oryzias latipes*). În special, substanțele chimice cu anumite moduri de acțiune pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la animalele de sex opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi trenbolonul, metiltestosteronul și dihidrotestosteronul pot cauza dezvoltarea de tuberculi nupțiali proeminenți la femelele de *Pimephales promelas* sau dezvoltarea de procese papilare la femelele de *Oryzias latipes* (11, 20, 21). De asemenea, s-a raportat faptul că agoniștii receptorilor estrogenici pot reduce numărul de tuberculi nupțiali și dimensiunea depozitelor subcutanate dorsale ale masculilor adulți (25, 26). Aceste observații morfologice macroscopice pot furniza informații calitative și cantitative utile pentru potențialele viitoare cerințe privind testarea peștilor. Numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali ai *Pimephales promelas* și ale procesele papilare ale *Oryzias latipes* pot fi cuantificate direct sau, mai practic, în eșantioanele conservate. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes* sunt disponibile în apendicele 5A și, respectiv, apendicele 5B.

Vitelogenina (VTG)

41. Se prelevează sânge din artera/vena caudală cu un tub capilar microhematocrit heparinizat sau, alternativ, printr-o puncție cardiacă cu ajutorul unei seringi. În funcție de mărimea peștelui, volumul de sânge prelevat se încadrează în general între 5 și 60 µl pe individ în cazul *Pimephales promelas* și între 5 și 15 µl pe individ în cazul peștelui-zebră. Plasma este separată de sânge prin centrifugare și este depozitată cu inhibitori de protează la o temperatură de – 80 °C până ce este analizată pentru a măsura vitelogenina. Alternativ, în cazul *Oryzias latipes* se va utiliza ficatul, iar în cazul peștelui-zebră, omogenatul de cap/coadă poate fi utilizat ca țesut-sursă pentru determinarea vitelogeninei (apendicele 6). Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă ELISA omoloagă validată, utilizând un standard omolog de VTG și anticorpi omologi. Se recomandă utilizarea unei metode capabile să detecteze nivelurile de VTG de ordinul a câteva ng/ml de plasmă (sau ng/mg de țesut), care reprezintă nivelul de fond la masculii neexpuși.

42. Controlul calității măsurării vitelogeninei se va realiza prin utilizarea de soluții standard, de probe-martor și, cel puțin, de teste duplicat. Pentru fiecare metodă ELISA, trebuie realizat un test al efectului matricial (efectul de diluție a probei) pentru a determina factorul de diluție minimă a probei. Fiecare placă ELISA utilizată pentru testele VTG trebuie să includă următoarele probe de control al calității: cel puțin 6 soluții standard de calibrare care acoperă intervalul de concentrații de vitelogenină preconizate și cel puțin o probă-martor de testare de legare nespecifică (analizată în duplicat). Absorbanța acestor probe-martor trebuie să fie mai mică de 5 % din absorbanța maximă a soluțiilor standard de calibrare. Vor fi analizate cel puțin două alicote (duplicate godeu) din fiecare diluție a probei. Duplicatele godeu care diferă cu un procent mai mare de 20 % trebuie reanalizate.

43. Coeficientul de corelație (R^2) al curbelor de calibrare trebuie să fie mai mare de 0,99. Cu toate acestea, o corelație mare nu este suficientă pentru a garanta o predicție adecvată a concentrației pentru toate intervalele. În plus față de o corelație suficient de mare pentru curba de calibrare, concentrația fiecărei soluții standard, calculată pornind de la curba de calibrare, trebuie să se încadreze între 70 și 120 % din concentrația sa nominală. În cazul în care concentrațiile nominale tind să se îndepărteze de linia de

▼M6

regresie a calibrării (de exemplu, spre concentrații mai mici), poate fi necesară împărțirea curbei de calibrare în intervale de concentrații mici și mari sau utilizarea unui model neliniar pentru a ajusta în mod adecvat datele privind absorbanța. În cazul împărțirii curbei, ambele segmente de linie trebuie să aibă valoarea $R^2 > 0,99$.

44. Limita de detecție (LOD) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice, iar limita de cuantificare (LOQ) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice înmulțită cu cel mai mic factor de diluție.

45. În fiecare zi în care sunt efectuate măsurări ale vitelogeninei va fi analizată o probă fortificată utilizând un standard de referință interteste (apendicele 7). Raportul dintre concentrația preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea răspunsurilor biomarkerilor prin analiza varianței (ANOVA)

46. Pentru a identifica potențiala activitate endocrină a unei substanțe chimice, răspunsurile grupurilor tratate sunt comparate cu cele ale grupurilor de control utilizând analiza varianței (ANOVA). În cazul în care se utilizează un solvent de control, trebuie efectuat un test statistic corespunzător între apa de diluție și solventul de control pentru fiecare parametru studiat. Orientări cu privire la interpretarea datelor referitoare la apa de diluție și solventul de control în cadrul analizei statistice ulterioare sunt disponibile în OCDE, 2006c (27). Toate datele privind răspunsurile biologice trebuie analizate și raportate separat per sex. Dacă nu sunt îndeplinite ipotezele necesare pentru metodele parametrice – distribuție anormală (de exemplu, testul Shapiro-Wilk) sau variață eterogenă (testul Barlett sau testul Levene) – trebuie luată în considerare transformarea datelor în scopul omogenizării variațelor înainte de efectuarea analizei varianței sau efectuarea unei analize ponderate a varianței. Testul Dunnett (parametric) care permite comparații multiple pe perechi sau testul Mann-Whitney cu ajustare Bonferroni (neparametrică) poate fi utilizat pentru un raport doză-răspuns nemonoton. Pot fi utilizate alte teste statistice (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra sau testul Williams), în cazul în care raportul doză-răspuns este aproximativ monoton. În apendicele 8 este furnizată o diagramă statistică care ajută la luarea unei decizii cu privire la alegerea testului statistic cel mai adecvat pentru a fi utilizat. Informații suplimentare pot fi obținute și din Documentul OCDE privind metodele actuale de analiză statistică a datelor de ecotoxicitate (27).

Raportarea rezultatelor testului

47. Datele studiului trebuie să includă:

Facilitatea de testare:

— Personalul responsabil și responsabilitățile sale în cadrul studiului

— Fiecare laborator trebuie să își fi demonstrat competența prin utilizarea unei game de substanțe chimice reprezentative

Substanța chimică de testare:

— Caracterizarea substanței chimice de testare

— Natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante

▼**M6**

— Metoda și frecvența preparării concentrațiilor de testare

— Informații privind stabilitatea și biodegradabilitatea

Solventul:

— Caracterizarea solventului (natura, concentrația utilizată)

— Justificarea alegerii solventului (în cazul în care acesta nu este apa)

Animalele pentru testare:

— Specia și subspecia

— Furnizorul și unitatea specifică a furnizorului

— Vârsta peștilor la începutul testului și stadiul de reproducere/de eliberare a gameților

— Detalii cu privire la procedura de aclimatizare a animalelor

— Greutatea corporală a peștilor la începutul expunerii (dintr-un subeșantion din stocul de pești)

Condiții de testare:

— Procedura de testare utilizată (tipul testului, rata de încărcare, densitatea populației, etc.);

— Metoda de preparare a soluțiilor stoc și debitul;

— Concentrațiile nominale de testare, concentrațiile măsurate săptămânal ale soluțiilor de testare și metoda analitică utilizată, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard în vasele de testare și dovada faptului că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței chimice de testare în soluție veritabilă;

— Caracteristicile apei de diluție (incluzând pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual, carbonul organic total, solidele în suspensie și orice altă măsurătoare efectuată)

— Calitatea apei din vasele de testare: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;

— Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul de aliment (alimente), sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele privind contaminanți relevanți, dacă sunt disponibile (de exemplu, BPC, HAP și pesticide organoclorurate)].

Rezultate

— Dovada că soluțiile de control îndeplinesc criteriile de acceptare a testului;

— Datele privind mortalitățile pentru fiecare nivel de concentrație de testare și pentru fiecare control;

— Tehnicile de analiză statistică utilizate, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor utilizate;

— Datele privind observațiile biologice de morfologie macroscopică, inclusiv caracteristicile sexuale secundare și vitelogenina;

▼**M6**

— Rezultatele analizelor datelor, de preferință sub formă de tabele și de grafice;

— Incidența oricărei reacții neobișnuite a peștilor și a oricărui efect vizibil provocat de substanța chimică de testare

ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR TESTULUI

48. Această secțiune include câteva observații care trebuie luate în considerare pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește diferiții parametri măsurați. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul în care substanța chimică de testare pare a cauza semne evidente de toxicitate sau a afecta starea generală a animalului testat.

49. La stabilirea intervalului de concentrații de testare, nu trebuie să se depășească concentrația maximă tolerată pentru a permite o interpretare corespunzătoare a datelor. Este important să se aplice cel puțin un tratament care să nu determine semne ale unor efecte toxice. Semnele de boală și semnele unor efecte toxice trebuie evaluate și raportate în detaliu. De exemplu, producția de VTG la femele poate fi, de asemenea, afectată de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine, de exemplu de hepatotoxicitate. Cu toate acestea, interpretarea efectelor poate fi consolidată prin alte niveluri de tratament, ele nefiind mascate de toxicitatea sistemică.

50. Există câteva aspecte care trebuie luate în considerare pentru acceptarea rezultatelor testului. Cu titlu orientativ, nivelurile de VTG la grupele de control de masculi și de femele trebuie să fie distincte și separate de aproximativ trei ordine de mărime în cazul *Pimephales promelas* și al peștelui-zebră și de aproximativ un ordin de mărime în cazul *Oryzias latipes*. Exemple ale intervalului de valori întâlnite la grupele de control și la grupele tratate sunt disponibile în rapoartele de validare (1, 2, 3, 4). Valori mari ale VTG la masculii din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta agoniștii estrogenici slabi. Valori mici ale VTG la femelele din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta inhibitorii aromatazei și antagoniștii estrogenici. Studiile de validare au fost utilizate pentru a elabora această orientare.

51. În cazul în care un laborator nu a realizat anterior testul sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea subspeciei sau a furnizorului de pești), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică. Se recomandă utilizarea unor substanțe chimice care posedă o serie de moduri de acțiune sau de impacturi asupra unor parametri studiați. Practic, fiecare laborator este încurajat să își elaboreze propriile date istorice de control pentru masculi și femele și să efectueze teste cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea estrogenică (de exemplu, 17β-estradiol la 100 ng/l sau un agonist slab cunoscut) având ca rezultat creșterea VTG la masculi, cu o substanță chimică de control pozitivă pentru inhibarea aromatazei (de exemplu, fadrozol sau procloraz la 300 µg/l) având ca rezultat scăderea VTG la femele și cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea androgenică (de exemplu, 17β-trenbolon la 5 µg/l) având ca rezultat inducerea caracteristicilor sexuale secundare la femelele de *Pimephales promelas* și de *Oryzias latipes*. Toate aceste date pot fi comparate cu datele disponibile din studiile de validare (1, 2, 3) pentru a garanta competența laboratorului.

52. În general, măsurătorile vitelogeninei trebuie considerate pozitive în cazul unei creșteri semnificative statistic a VTG la masculi ($p < 0,05$) sau în cazul unei scăderi semnificative statistic la femele ($p < 0,05$) cel puțin la doza maximă testată în comparație cu grupul de control și în absența semnelor de toxicitate generală. Un rezultat pozitiv este confirmat și prin demonstrarea unei relații plauzibilă din punct de vedere biologic între doză și curba răspunsurilor. Astfel cum s-a menționat anterior, scăderea vitelogeninei poate să nu fie în totalitate de origine endocrină; cu toate acestea, un rezultat pozitiv trebuie să fie, în general, interpretat ca o dovadă a activității endocrine *in vivo* și trebuie să genereze în mod normal acțiuni pentru clarificări suplimentare.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼M6

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts," not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼**M6**

Apendicele 1

Abrevieri și definiții

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

CV: coeficient de variație.

ELISA: test de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic.

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștilor per volum de apă.

Densitatea populației: numărul de pești per volum de apă.

VTG (vitelogenină): fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

Axul HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

CMT: concentrația maximă tolerată, reprezentând aproximativ 10 % din CL_{50} (concentrația letală).

Substanța chimică de testare: orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

▼**M6**

Apendicele 2

Condiții experimentale pentru testul de screening endocrin la pești

1. Specii recomandate	*Pimephales promelas*	*Oryzias latipes*	**Peștele-zebră** (*Danio rerio*)
2. Tip de test	În regim dinamic	În regim dinamic	În regim dinamic
3. Temperatura apei	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)
5. Intensitatea luminii	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)
6. Perioada de expunere la lumină (tranzițiile răsărit-apus sunt opționale, cu toate acestea nu sunt considerate necesare)	16 h de lumină, 8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric
7. Rata de încărcare	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Dimensiunea camerelor de testare	10 l (minimum)	2 l (minimum)	5 l (minimum)
9. Volumul soluției de testare	8 l (minimum)	1,5 l (minimum)	4 l (minimum)
10. Volumele soluțiilor de testare schimbate	Minimum 6/zi	Minimum 5/zi	Minimum 5/zi
11. Vârsta organismelor testate	A se vedea punctul 20.	A se vedea punctul 20.	A se vedea punctul 20.
12. Greutatea umedă aproximativă a peștilor adulți (g)	Femele: 1,5 ± 20 % Masculi: 2,5 ± 20 %	Femele: 0,35 ± 20 % Masculi: 0,35 ± 20 %	Femele: 0,65 ± 20 % Masculi: 0,4 ± 20 %
13. Nr. de pești per vas de testare	6 (2 masculi și 4 femele)	10 (5 masculi și 5 femele)	10 (5 masculi și 5 femele)
14. Nr. de tratamente	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)
15. Nr. de vase per tratament	4 minimum	2 minimum	2 minimum
16. Nr. de pești per concentrație testată	16 femele adulte și 8 masculi adulți (4 femele și 2 masculi în fiecare vas duplicat)	10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)	10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)
17. Regimul de hrănire	Adulți sau nauplius de *Artemia*, vii sau congelați, de două sau de trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de *Artemia* de două sau de trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de *Artemia* de două sau trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate

▼**M6**

18. Aerarea	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer
19. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată
20. Perioada de preexpunere	Perioadă recomandată de 7 zile	Perioadă recomandată de 7 zile	Perioadă recomandată de 7 zile
21. Durata expunerii la substanța chimică	21 de zile	21 de zile	21 de zile
22. Parametri biologici studiați	supraviețuire comportament caracteristici sexuale secundare VTG	supraviețuire comportament caracteristici sexuale secundare VTG	supraviețuire comportament VTG
23. Criterii de acceptare a testului	Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de 25 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament.	Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de 24 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament.	Oxigen dizolvat > 60 % din saturație; temperatura medie de 26 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrațiile de testare măsurate menținute în limita a 20 % din valorile medii măsurate pentru fiecare nivel de tratament.

▼**M6**

Apendicele 3

Câteva caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile

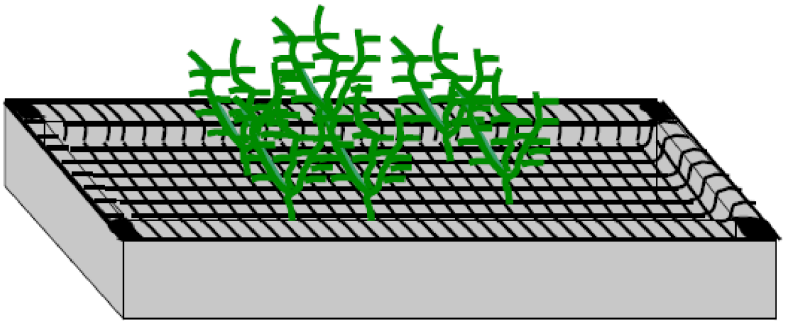
Componentă	Concentrații
Particule în suspensie	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Total pesticide organofosforice	< 50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	< 50 ng/l
Total clor organic	< 25 ng/l

▼M6

Apendicele 4 A

Substratul de reproducere pentru peștele-zebră

Tavă de reproducere: tavă instrumentară în întregime din sticlă, cu dimensiuni de exemplu de 22 × 15 × 5,5 cm (L × l × î), acoperită cu o sită mobilă din oțel inoxidabil (orificii de 2 mm). Sita trebuie să acopere deschiderea tăvii instrumentare la un nivel situat mai jos decât marginea ei.



Substratul de reproducere se fixează pe sită. Se formează o structură în care pot pătrunde peștii. De exemplu, sunt adecvate plante de acvariu artificiale realizate din plastic de culoare verde (NB: trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței chimice de testare în materialul din plastic). Plasticul trebuie să fie curățat cu o cantitate suficientă de apă caldă pentru o perioadă suficientă pentru a se asigura că nicio substanță chimică nu poate pătrunde în apa de testare. Dacă se utilizează materiale din sticlă, trebuie avut grijă ca peștii să nu se rănească sau să se înghesuie în timpul deplasărilor.

Distanța dintre tavă și pereții din sticlă trebuie să fie de cel puțin 3 cm pentru a se asigura că eliberarea gameților nu se realizează în afara tăvii. Ouăle depuse pe tavă cad printre ochiurile sitei și pot fi prelevate la 45-60 de minute după pornirea iluminării. Ouăle transparente nu se lipesc și pot fi ușor numărate în condiții de iluminare transversală. Atunci când se utilizează cinci femele pentru fiecare vas, numărul de ouă este considerat mic dacă este de maximum 20 pe zi, mediu dacă este de maximum 100 și mare dacă este peste 100. Tava de reproducere trebuie îndepărtată, ouăle colectate, iar tava reintrodusă în vasul de testare, fie seara la o oră cât mai târzie, fie dimineața foarte devreme. Perioada până la reintroducere nu trebuie să depășească o oră, întrucât, în caz contrar, semnalul substratului de reproducere poate induce împerecherea individuală și eliberarea gameților într-un moment neobișnuit. Dacă situația impune introducerea mai târziu a tăvii de reproducere, aceasta trebuie să se efectueze cu cel puțin 9 ore după pornirea iluminării. La această oră târzie din zi, eliberarea gameților nu mai este indusă.

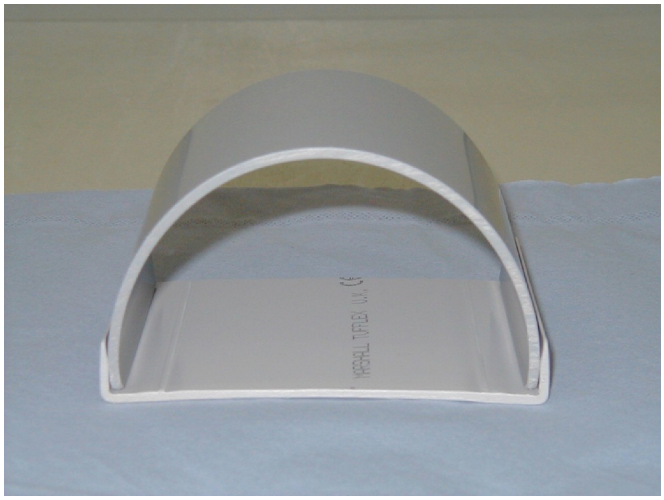
▼**M6**

Apendicele 4 B

Substratul de reproducere pentru *Pimephales promelas*

Două sau trei plăci și tăvi de reproducere din plastic/ceramică/sticlă sau oțel inoxidabil combinate sunt așezate în fiecare cameră de testare (de exemplu, un jgheab semicircular de culoare gri cu o lungime de 80 mm, așezat pe o tavă cu margini ridicate cu o lungime de 130 mm) (a se vedea imaginea). S-a demonstrat că plăcile din PVC sau din ceramică tratate în mod corespunzător sunt adecvate pentru un substrat de reproducere (Thorpe et al, 2007).

Se recomandă ca plăcile să fie șlefuite pentru a îmbunătăți aderența. Tava trebuie să fie, de asemenea, prevăzută cu un ecran de protecție pentru a împiedica accesul peștilor la ouăle căzute, cu excepția cazului în care eficiența aderenței ouălor a fost demonstrată pentru substratul de reproducere utilizat.



Baza este concepută pentru a reține toate ouăle care nu aderă la suprafața plăcilor și care, în consecință, ar cădea pe fundul bazinului (sau acele ouă să fie depuse direct pe baza plană din plastic). Toate substraturile de reproducere trebuie curățate înainte de utilizare timp de cel puțin 12 ore în apă de diluție.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Apendicele 5 A

Evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* pentru detectarea anumitor substanțe chimice care acționează la nivel endocrin

Prezentare generală

În cazul adulților de *Pimephales promelas*, caracteristicile aspectului fizic potențial importante în cadrul testării perturbatorilor endocrini includ culoarea corpului (deschisă/închisă), modelele de colorație (prezența sau absența unor dungi verticale), forma corpului (forma capului și a regiunii pectorale, distensia abdomenului), precum și caracteristicile sexuale secundare specializate (numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali, dimensiunea depozitului subcutanat dorsal și ovipozitorul).

Tuberculii nupțiali sunt situați pe cap (depozit subcutanat dorsal) la masculii de *Pimephales promelas* activi din punct de vedere reproductiv și sunt de obicei dispuși bilateral simetric (Jensen et al. 2001). Femelele de control și masculii și femelele tinere nu dezvoltă tuberculi (Jensen et al. 2001). La masculi, numărul de tuberculi individuali situați în jurul ochilor și între nări este de maximum opt. Cei mai mulți și mai mari tuberculi sunt așezați sub forma a două șiruri paralele imediat sub nări și deasupra gurii. Numeroși pești au grupuri de tuberculi sub mandibulă; cei situați cel mai aproape de gură apar în general într-o singură pereche, în timp ce setul situat mai ventral se poate compune din până la patru tuberculi. Numărul efectiv de tuberculi este rareori mai mare de 30 (interval 18-28; Jensen et al. 2001). Tuberculii predominanți (din punctul de vedere al numărului) sunt prezenți sub forma unei structuri singulare, relativ rotunde, cu înălțimea aproximativ echivalentă cu raza. Cei mai mulți masculi activi din punct de vedere reproductiv au, de asemenea, cel puțin câțiva tuberculi măriți și pronunțați astfel încât nu pot fi distinși ca structuri individuale.

Unele tipuri de substanțele chimice cu efecte la nivel endocrin pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la sexul opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi 17β-metiltestosteronul sau 17β-trenbolonul, pot cauza apariția de tuberculi nupțiali la femelele de *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), în timp ce agoniști ai receptorilor estrogenici pot reduce numărul sau dimensiunea tuberculilor nupțiali la masculi (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

În continuare este prezentată o descriere a caracterizării tuberculilor nupțiali la *Pimephales promelas* pe baza procedurilor utilizate în cadrul laboratorului Agenției de Protecție a Mediului din SUA din Duluth, Minnesota. Produsele și/sau echipamentele specifice pot fi înlocuite cu materiale comparabile aflate la dispoziție.

Vizualizarea se realizează cel mai bine cu ajutorul unei lupe iluminate sau al unui microscop de disecție 3X iluminat. Peștele este observat din partea dorsală și cu partea anterioară înainte (capul spre observator).

a) Se așează peștele într-o placă Petri mică (de exemplu, cu diametrul de 100 mm), cu partea anterioară înainte și cu partea ventrală în jos. Se reglează vizorul pentru a putea identifica tuberculii. Se rulează peștele ușor și încet de pe o parte pe alta pentru a identifica zonele cu tuberculi. Se numără și se clasifică tuberculii.

b) Se repetă observația pe partea ventrală a capului după ce s-a așezat peștele în placa Petri cu partea dorsală anterioară înainte.

c) Observațiile nu ar trebui să dureze mai mult de 2 minute pentru fiecare pește.

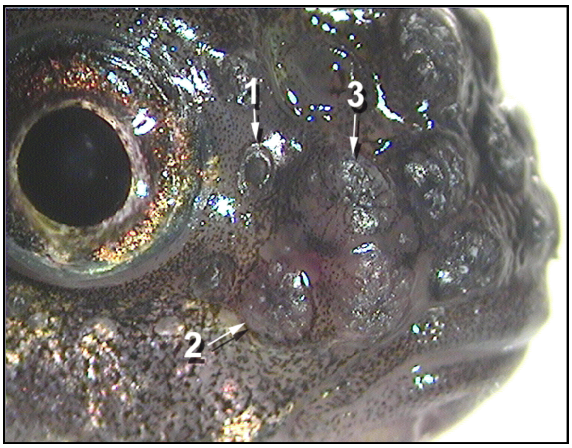
▼M6

Numărarea și clasificarea tuberculilor

Au fost identificate șase zone specifice pentru evaluarea prezenței și dezvoltării de tuberculi la adulții de *Pimephales promelas*. A fost creat un model pentru a cartografia localizarea și cantitatea tuberculilor prezenți (a se vedea partea de încheiere a prezentului apendice). Numărul tuberculilor este înregistrat, iar dimensiunea lor poate fi clasificată cantitativ astfel: 0- absent, 1-prezent, 2-mărit și 3-pronunțat pentru fiecare organism (Fig. 1).

Categoria 0 – absența oricărui tubercul. Categoria 1 – tubercul prezent, identificat ca orice tubercul care are un singur punct a cărui înălțime este aproape echivalentă cu raza sa (diametru). Categoria 2 – tubercul mărit, identificat prin țesutul sub formă de asterisc, prezentând de obicei o bază radială mare cu șanțuri sau caneluri care pornesc din centru. Cupola tuberculului este adesea mai neregulată, însă uneori poate fi întrucâtva rotunjită. Categoria 3 – tubercul pronunțat, de obicei foarte mare și rotunjit cu o structură mai puțin definită. Uneori, acești tuberculi se grupează formând o singură masă de-a lungul unei zone sau a mai multor zone (B, C și D, descrise mai jos). Colorația și forma sunt similare celor din categoria 2, însă, uneori, sunt destul de greu de distins. Utilizând acest sistem de clasificare va conduce în general la un scor < 50 la un mascul normal din grupul de control care posedă un număr de tuberculi cuprins între 18 și 20 (Jensen et al. 2001).

Figura 1



Numărul efectiv de tuberculi la unii pești poate fi mai mare decât cel indicat în casetele model (apendicele A) pentru o anumită zonă de clasificare. În acest caz, cifrele suplimentare pot fi marcate în interior, la dreapta sau la stânga casetei. Prin urmare, modelul nu trebuie să afișeze o simetrie. O altă tehnică pentru cartografierea tuberculilor perechi sau grupați vertical de-a lungul planului orizontal al gurii ar putea consta în dubla marcare a două puncte de clasificare a tuberculilor într-o singură casetă.

Zonele cartografiate:

A – Tuberculii situați în jurul ochilor. Localizați dorsal spre ventral în jurul marginii anterioare a ochilor. De obicei multiplii la masculii maturi din grupul de control, absenți la femelele din grupul de control, dispuși în general în perechi (câte unul lângă fiecare ochi) sau singuri la femelele expuse la androgeni.

B – Tuberculii situați între nări (porii canalelor senzoriale). De obicei dispuși în perechi la masculii din grupul de control la niveluri de dezvoltare mai mari (2-mărit sau 3- pronunțat). Absenți la femelele din grupul de control, însă uneori prezenți și dezvoltați la femelele expuse la androgeni.

C – Tuberculii situați imediat anterior nărilor, paralel cu gura. În general măriți sau pronunțați la masculii maturi din grupul de control. Prezenți sau măriți la masculii mai puțin dezvoltați sau la femelele tratate cu androgeni.

▼M6

D – Tuberculi situați paralel cu linia gurii. În general clasificați ca dezvoltați la masculii din grupul de control. Absenți la femelele din grupul de control, însă prezenți la femelele expuse la androgeni.

E – Tuberculii situați pe mandibulă, aproape de gură, de obicei de mici dimensiuni și în general dispuși în perechi. Variabili la masculii din grupul de control sau tratați și la femelele tratate.

F – Tuberculii situați ventral față de E. De obicei de mici dimensiuni și dispuși în perechi. Prezenți la masculii din grupul de control și la femelele expuse la androgeni.

BIBLIOGRAFIE

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

Model de tuberculi	**Clasificare numerică**
ID _____	1-prezent
Data _____	2-mărit
Scor total _____	3-pronunțat

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

Apendicele 5 B

Evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Oryzias latipes* pentru detectarea anumitor substanțe chimice care acționează la nivel endocrin

Mai jos este prezentată o descriere a măsurării proceselor papilare (*), care sunt caracteristici sexuale secundare ale *Oryzias latipes*.

(*) Procesele papilare apar în mod normal numai la masculii adulți și sunt situate pe nervurile înotătoarei, pornind de la cea de a doua până la cea de a șaptea sau a opta nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale (Fig. 1 și 2). Cu toate acestea, procesele papilare apar rareori pe prima nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale. Această procedură de operare standard (POS) cuprinde măsurarea proceselor de pe prima nervură a înotătoarei (numărul nervurilor este calculat în cadrul acestei POS pornind de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale).

(1) După excizia ficatului (apendicele 6), carcasa este așezată într-un tub conic care conține aproximativ 10 ml de formol neutru 10 % tamponat (cu capul în sus și cu coada în jos). În cazul în care gonada este fixată într-o altă soluție decât formol neutru 10 % tamponat, se realizează cu ajutorul unei lame tăietoare o incizie transversală în carcasă între regiunea anterioară a înotătoarei anale și anus, având grijă să nu se lezeze gonoporul și gonada însăși (Fig. 3). Se introduce capul peștelui în soluția fixativă pentru a conserva gonadele, iar coada peștelui în formol neutru tamponat 10 % conform descrierii de mai sus.

(2) După ce se introduce corpul peștelui în formol neutru tamponat 10 %, se prinde regiunea anterioară a înotătoarei anale cu ajutorul unei pensete și se pliază timp de 30 de secunde pentru a menține deschisă înotătoarea anală. Prinzând înotătoarea anală cu ajutorul unei pensete, se prind câteva nervuri ale înotătoarei din regiunea anterioară având grijă să nu se zgârie procesele papilare.

(3) După menținerea deschisă a înotătoarei anale timp de aproximativ 30 de secunde, se introduce corpul peștelui în formol neutru 10 % tamponat la temperatura camerei și se lasă astfel până la măsurarea proceselor papilare (măsurarea trebuie efectuată după fixare timp de cel puțin 24 de ore).

Măsurare

(1) După fixarea corpului peștelui în formol neutru 10 % tamponat timp de cel puțin 24 de ore, se scoate carcasa peștelui din tubul conic și se șterge formolul cu hârtie de filtru (sau un șervet de hârtie).

(2) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se taie apoi cu grijă înotătoarea anală cu ajutorul unei foarfeci mici de disecție (este de preferat să se taie înotătoarea anală cu puțin pterigiofor).

(3) Se prinde cu ajutorul unei pensete zona anterioară a înotătoarei anale excizate și se așează pe o lamelă din sticlă cu câteva picături de apă. Se acoperă apoi înotătoarea anală cu o altă lamelă din sticlă. Se procedează cu grijă pentru a nu se zgâria procesele papilare în momentul prinderii înotătoarei anale cu penseta.

(4) Se determină numărul de plăci comune care prezintă procese papilare cu ajutorul unui contor sub un microscop biologic (microscop drept sau microscop inversat). Procesele papilare sunt recunoscute atunci când o mică formațiune de procese este vizibilă pe marginea posterioară a plăcii

▼M6

comune. Se notează pe foaia de lucru numărul de plăci comune care prezintă procese papilare pentru fiecare nervură a înotătoarei (de exemplu, prima nervură: 0, a doua nervură: 10, a treia nervură: 12, etc.) și se notează suma acestor numere în fișa Excel pentru fiecare pește în parte. Dacă este necesar, se fotografiază înotătoarea anală și se determină pe fotografie numărul de plăci comune care prezintă procese papilare.

(5) După măsurare, se introduce înotătoarea anală în tubul conic descris la punctul (1) și se depozitează.

Fig. 1.

Diagramă care ilustrează diferența de formă și de dimensiune a înotătoarei anale între sexe. A, mascul; B, femelă. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

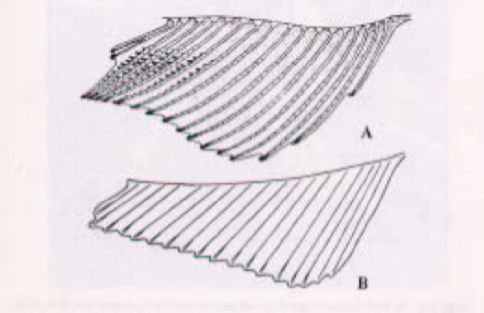
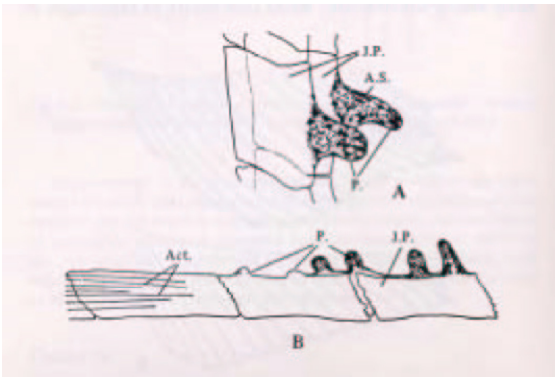


Fig. 2.

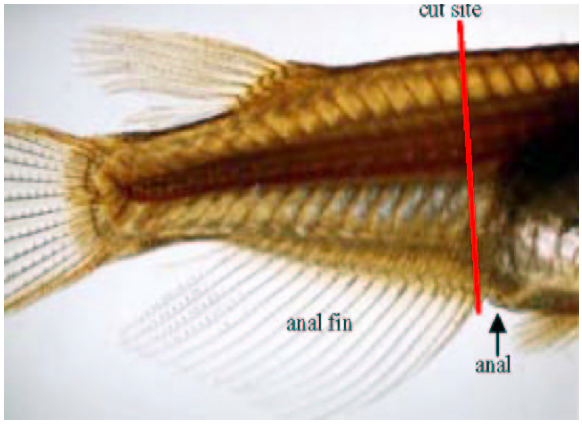
A, Procese papilare pe plăcile comune ale înotătoarei anale. J.P., placă comună; A.S., spațiu axial; P., proces. B, Extremitatea distală a înotătoarei anale. Actinotrichiile (Act.) sunt situate la vârf. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼M6

Fig. 3.

Fotografia unui corp de pește care ilustrează locul inciziei atunci când gonada este fixată într-o altă soluție de fixare decât formol neutru 10 % tamponat. În acest caz, corpul restant va fi tăiat între zona anterioară a înotătoarei anale și anus cu ajutorul unei lame tăietoare (linia roșie), iar capul peștelui va fi introdus în soluția de fixare pentru gonade și partea corpului dinspre coadă va fi introdusă în formol neutru 10 % tamponat.



▼M6

Apendicele 6

Proceduri recomandate de prelevare a probelor pentru analiza vitelogeninei

Se procedează cu grijă pentru a evita contaminarea încrucișată între probele VTG ale masculilor și femelelor.

Procedura 1 A: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din vena/artera caudală

După anesteziere, pedunculul caudal este parțial secționat cu o lamă de bisturiu și se recoltează sânge din vena/artera caudală cu un tub capilar heparinizat microhematocrit. După prelevarea sângelui, plasma este separată rapid prin centrifugare timp de 3 minute la 15 000 *g* (sau, alternativ, timp de 10 minute la 15 000 g la o temperatură de 4 °C). Dacă se dorește, procentul de hematocrit poate fi determinat în urma centrifugării. Plasma este apoi extrasă din tubul microhematocrit și depozitată într-un tub de centrifugare cu 0,13 unități de aprotinină (un inhibitor de protează) la o temperatură de – 80 °C până când poate fi determinată vitelogenina. În funcție de dimensiunea *Pimephales promelas* (care depinde de sex), volumele de plasmă care pot fi prelevate sunt cuprinse între 5 și 60 de microlitri per pește (Jensen *et al.* 2001).

Procedura 1B: *Pimephales promelas*, prelevare de sânge din inimă

Alternativ, sângele poate fi prelevat și printr-o puncție cardiacă realizată cu ajutorul unei seringi heparinizate (1 000 de unități de heparină/ml). Sângele este transferat în tuburi Eppendorf (ținute în gheață) și apoi centrifugat (5 minute, 7 000 g, la temperatura camerei). Plasma trebuie transferată în tuburi Eppendorf curate (în alicote, dacă volumul de plasmă permite acest lucru) și congelată rapid la – 80 °C până ce este analizată (Panter et al., 1998).

Procedura 2A: *Oryzias latipes*, excizie a ficatului

Extragerea peștilor pentru testare din camera de testare

(1) Peștii pentru testare trebuie scoși din camera de testare cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni. Se procedează cu grijă pentru a nu scăpa peștii pentru testare în alte camere de testare.

(2) În principiu, peștii pentru testare trebuie să fie scoși în următoarea ordine: din vasul de control, vasul de control cu solvent (dacă este cazul), vasul cu cea mai mică concentrație, vasul cu concentrația medie, vasul cu cea mai mare concentrație și vasul de control pozitiv. În plus, trebuie extrași toți masculii dintr-o cameră de testare înainte de extragerea femelelor rămase.

(3) Sexul fiecărui pește pentru testare este identificat pe baza caracteristicilor sexuale secundare externe (de exemplu, forma înotătoarei anale).

(4) Se așează peștii pentru testare într-un container de transport și se transportă la stația de lucru pentru excizia ficatului. Se verifică etichetele camerei de testare și containerul de transport pentru precizie și pentru a confirma faptul că numărul peștilor scoși din camera de testare și numărul peștilor rămași în camera de testare sunt conforme celor preconizate.

(5) În cazul în care sexul nu poate fi stabilit pe baza aspectului exterior al peștelui, se îndepărtează toți peștii din camera de testare. În acest caz, sexul este identificat prin observarea gonadei sau a caracteristicilor sexuale secundare cu ajutorul unui microscop stereoscopic.

▼**M6**

Excizia ficatului

(1) S transferă peștii pentru testare din containerul de transport în soluția anestezică cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni.

(2) După anestezierea peștilor pentru testare, ei sunt transferați pe o hârtie de filtru (sau pe un șervet de hârtie) cu ajutorul unei pensete (obișnuite). Când se prind peștii pentru testare, se aplică brațele pensetei de o parte și de alta a capului pentru a evita ruperea cozii.

(3) Se șterge apa de pe suprafața peștilor pentru testare cu o hârtie de filtru (sau cu un șervet de hârtie).

(4) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se efectuează apoi o mică incizie transversală între zona ventrală a gâtului și zona de mijloc a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci de disecție.

(5) Se introduce foarfeca de disecție în incizia mică și se efectuează o incizie de-a lungul liniei mediane a abdomenului, de la un punct caudal la mantaua branhială până la partea craniană a anusului. Se procedează cu grijă pentru a nu se introduce foarfeca de disecție prea adânc evitându-se astfel distrugerea ficatului și a gonadei.

(6) Se efectuează următoarele operațiuni la un microscop stereoscopic.

(7) Se așează peștele pentru testare cu abdomenul în sus pe un șervet de hârtie (se află la dispoziție și o placă Petri din sticlă sau o lamelă din sticlă).

(8) Se îndepărtează pereții cavității abdominale cu ajutorul unei pensete de precizie și se exteriorizează organele interne. Dacă este necesar, organele interne pot fi exteriorizate și prin înlăturarea unei părți a peretelui cavității abdominale.

(9) Se expune porțiunea care leagă ficatul de vezica biliară cu ajutorul unei alte pensete de precizie. Se prinde apoi canalul biliar și se excizează vezicula biliară. Se procedează cu grijă pentru a nu leza vezicula biliară.

(10) Se prinde esofagul și se separă prin excizare tractul gastrointestinal de ficat în același mod. Se procedează cu grijă pentru a nu vărsa conținutul tractului gastrointestinal. Se separă prin excizare tractul gastrointestinal caudal de anus și se îndepărtează tractul din cavitatea abdominală.

(11) Se taie masa de grăsime și alte țesuturi de la periferia ficatului. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria ficatul.

(12) Se prinde zona portală hepatică cu ajutorul pensetei de precizie și se extrage ficatul din cavitatea abdominală.

(13) Se așează ficatul pe o lamelă din sticlă. Cu ajutorul pensetei de precizie, se îndepărtează grăsimea și alte țesuturi (de exemplu, mucoasă abdominală), dacă este necesar, de pe suprafața ficatului.

(14) Se cântărește ficatul cu ajutorul unei balanțe analitice electronice, utilizând ca tară un microtub de 1,5 ml. Se înregistrează valoarea pe fișa de lucru (citire: 0,1 mg). Se confirmă informațiile de identificare pe eticheta microtubului.

(15) Se închide capacul microtubului care conține ficatul. Se depozitează într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).

(16) După excizia unui ficat, se curăță instrumentele de disecție sau se înlocuiesc cu unele curate.

▼M6

(17) Se excizează ficații de la toți peștii din containerul de transport conform descrierii de mai sus.

(18) După excizarea ficaților de la toți peștii din containerul de transport (adică, toți masculii sau toate femelele dintr-o cameră de testare), se așează toate eșantioanele de ficat pe un stativ pentru tuburi prevăzute cu o etichetă de identificare și se depozitează într-un congelator. Atunci când ficații sunt donați pentru pretratament la scurt timp după excizie, eșantioanele sunt transportate la stația de lucru următoare într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).

După excizia ficatului, carcasa peștelui este disponibilă pentru măsurarea caracteristicilor sexuale secundare.

Eșantion

Se depozitează eșantioanele de ficat prelevate de la pești la temperatura de ≤ – 70 °C în cazul în care nu sunt utilizate pentru pretratament la scurt timp după excizie.

Fig-1

Se efectuează o incizie în partea anterioară a înotătoarelor pectorale cu ajutorul unei foarfeci.

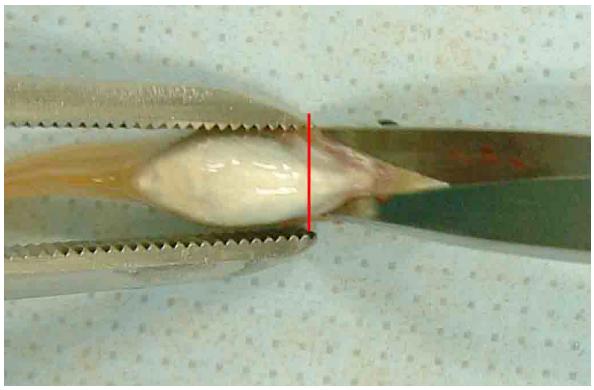
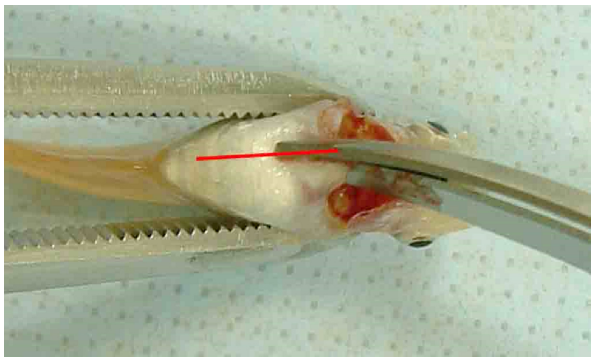


Fig-2

Se efectuează o incizie pe linia mediană a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci spre un punct situat la aproximativ 2 mm cranial față de anus.



▼M6

Fig-3

Pereții abdominali sunt îndepărtați cu ajutorul unui forceps pentru a expune ficatul și celelalte organe interne. (Alternativ, pereții abdominali pot fi fixați cu ace lateral).

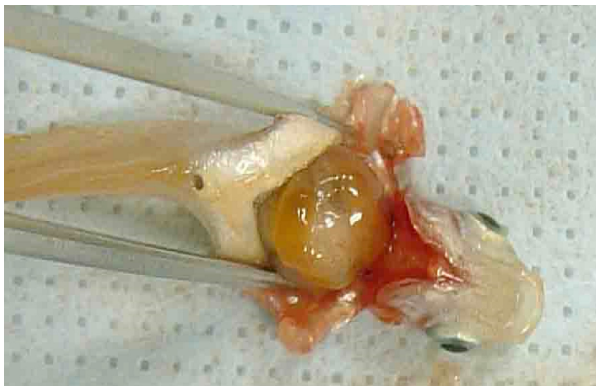


Fig-4

Ficatul este disecat și excizat cu ajutorul unui forceps.

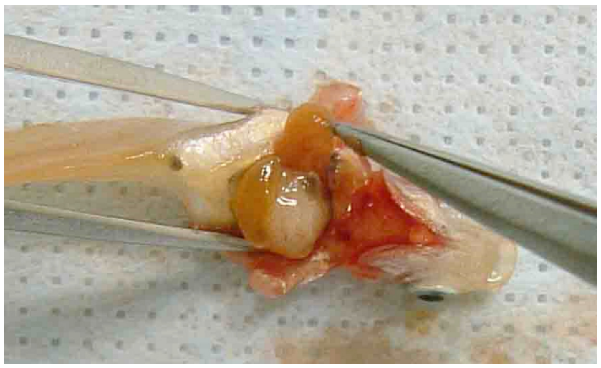


Fig-5

Intestinele sunt retrase ușor cu ajutorul unui forceps.



▼M6

Fig-6

Ambele capetele ale intestinelor și toate elementele mezenterice atașate sunt secționate cu ajutorul unei foarfeci.

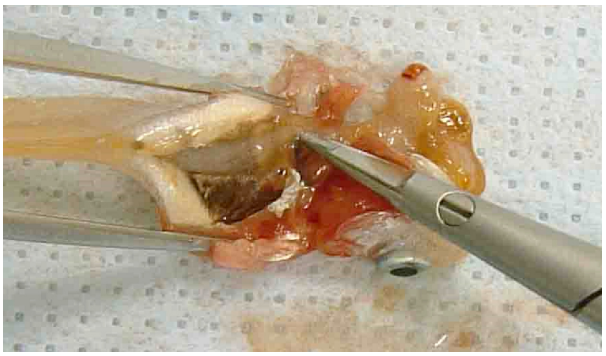


Fig-7 (femelă)

Procedura este identică în cazul femelei.

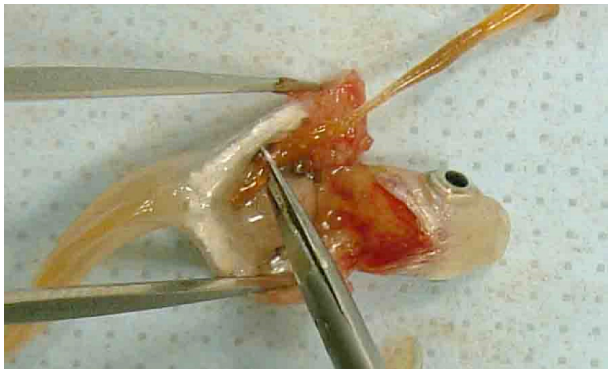
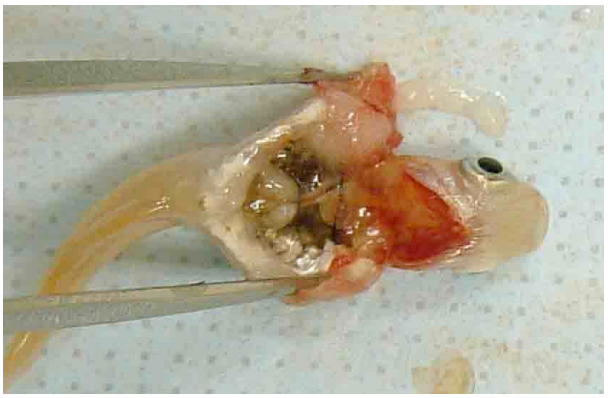


Fig-8

Procedura încheiată.



Procedura 2 B: *Oryzias latipes*, pretratament a ficatului pentru măsurarea vitelogeninei

Se ia flaconul cu tamponul de omogenat din trusa ELISA și se răcește în bucăți de gheață (temperatura soluției: ≤ 4 °C). În cazul în care se utilizează un tampon de omogenat din sistemul EnBio ELISA, se decongelează soluția până ajunge la temperatura camerei și apoi se răcește flaconul în bucăți de gheață.

▼**M6**

Se calculează volumul tamponului de omogenat pentru ficat pe baza greutății sale (se adaugă 50 µl de tampon de omogenat per mg de ficat pentru omogenat). De exemplu, în cazul în care greutatea ficatului este de 4,5 mg, volumul tamponului de omogenat pentru ficat este de 225 µl. Se întocmește o listă a volumelor de tampon de omogenat pentru toți ficații.

Se pregătește ficatul pentru pretratament.

(1) Se scoate de la congelator microtubul de 1,5 ml care conține ficatul chiar înainte de pretratament.

(2) Pretratamentul ficatului de la masculi trebuie realizat înaintea celui al femelelor pentru a evita contaminarea cu vitelogenină. În plus, pretratamentul pentru grupele de testare trebuie realizat în următoarea ordine: control, control cu solvent (dacă este cazul), cea mai mică concentrație, concentrație medie, cea mai mare concentrație și control pozitiv.

(3) Numărul microtuburilor de 1,5 ml care conțin probe de ficat scoase din congelator la un moment dat nu trebuie să depășească numărul care poate fi centrifugat în acel moment.

(4) Se aranjează microtuburile de 1,5 ml care conțin probe de ficat pe stativul cu gheață în ordinea numerotării eșantioanelor (nu este necesară decongelarea ficatului).

Efectuarea pretratamentului

1. Adăugarea tamponului de omogenizare

(1) Se verifică lista pentru a se identifica volumul de tampon de omogenat care trebuie utilizat pentru o anumită probă de ficat și se ajustează micropipeta (intervalul de volume: 100-1 000 µl) până la volumul adecvat. Se montează un vârf curat la micropipetă.

(2) Se extrage tamponul de omogenat din flaconul cu reactiv și se adaugă tamponul în microtubul de 1,5 ml care conține ficatul.

(3) Se adaugă tamponul de omogenat în toate microtuburile de 1,5 ml care conțin ficat conform procedurii descrise mai sus. Nu este necesară schimbarea vârfului micropipetei cu unul nou. Cu toate acestea, în cazul în care vârful este contaminat sau este suspectat a fi contaminat, acesta trebuie schimbat.

2. Omogenizarea ficatului

(1) Se atașează un nou pistil pentru omogenizare la omogenizatorul microtubului.

(2) Se introduce pistilul în microtubul de 1,5 ml. Se utilizează omogenizatorul microtubului pentru a presa ficatul între suprafața pistilului și peretele intern al microtubului de 1,5 ml.

(3) Se lasă omogenizatorul microtubului să funcționeze 10-20 de secunde. Se răcește microtubul de 1,5 ml cu ajutorul unor bucăți de gheață pe parcursul operațiunii.

(4) Se scoate pistilul din microtubul de 1,5 ml și se lasă deoparte aproximativ 10 secunde. Se efectuează apoi un control vizual al stării suspensiei.

(5) Dacă bucățile de ficat sunt observate în suspensie, se repetă operațiunile (3) și (4) pentru a pregăti în mod satisfăcător omogenatul de ficat.

▼**M6**

(6) Se răcește omogenatul de ficat în suspensie pe stativul cu gheață până în momentul centrifugării.

(7) Se schimbă pistilul cu unul nou pentru fiecare omogenat.

(8) Se omogenizează toți ficații cu tampon de omogenat conform procedurii descrise mai sus.

3. Centrifugarea omogenatului de ficat în suspensie

(1) Se fixează temperatura camerei centrifugii frigorifice la ≤ 5 °C.

(2) Se introduc microtuburile de 1,5 ml care conțin omogenatul de ficat în suspensie în centrifuga frigorifică (se ajustează dacă este necesar).

(3) Se centrifughează omogenatul de ficat în suspensie la 13 000 *g* timp de 10 min la ≤ 5 °C. Totuși, dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat, forța și timpul de centrifugare pot fi ajustate după necesități.

(4) După centrifugare, se verifică dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat (suprafață: lipide, intermediar: supernatant, strat inferior: țesut hepatic). Dacă separarea nu este adecvată, se centrifughează suspensia din nou în aceleași condiții.

(5) Se elimină toate probele din centrifuga frigorifică și se aranjează în ordinea numerotării eșantioanelor pe stativul cu gheață. Se procedează cu atenție pentru a nu resuspenda fiecare strat separat după centrifugare.

4. Colectarea supernatantului

(1) Se așează patru microtuburi de 0,5 ml pentru depozitarea supernatantului în stativul pentru tuburi.

(2) Se colectează 30 µl din fiecare supernatant (separat ca strat intermediar) cu micropipeta și se introduce într-un microtub de 0,5 ml. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

(3) Se colectează supernatantul și se introduce în celelalte două microtuburi de 0,5 ml în același mod ca cel descris mai sus.

(4) Se colectează restul supernatantului cu micropipeta (dacă este fezabil: ≥ 100 µl). Se introduce apoi supernatantul în microtubul de 0,5 ml rămas. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

(5) Se închide dopul microtubului de 0,5 ml și se notează volumul supernatantului pe etichetă. Apoi se răcesc imediat microtuburile pe stativul cu gheață.

(6) Se schimbă vârful micropipetei cu unul nou pentru fiecare supernatant. În cazul în care o cantitate mare de lipide se lipește de vârf, se schimbă imediat cu unul nou pentru a evita contaminarea extractului de ficat cu grăsime.

(7) Se repartizează întregul supernatant centrifugat în patru microtuburi de 0,5 ml în conformitate cu procedura descrisă mai sus.

▼M6

(8) După aceasta, toate se așează pe stativul pentru tuburi cu eticheta de identificare și apoi se introduc imediat în congelator. În cazul în care concentrațiile de VTG sunt măsurate imediat după pretratament, un microtub de 0,5 ml (conținând 30 µl de supernatant) se păstrează la rece în stativul pentru tuburi și se transferă în stația de lucru unde se realizează testul ELISA. În acest caz, se așează microtuburile rămase în stativele pentru tuburi și se introduc în congelator.

(9) După colectarea supernatantului, se elimină reziduurile în mod corespunzător.

Depozitarea eșantioanelor

Microtuburile de 0,5 ml conținând supernatantul omogenatului de ficat se depozitează la temperatura ≤ – 70 °C până în momentul utilizării acestora în cadrul testului ELISA..

Procedura 3 A: Peștele-zebră, prelevare de sânge din vena/artera caudală

Imediat după anestezie, se secționează transversal pedunculul caudal și se prelevează probe de sânge din artera/vena caudală cu ajutorul unui tub capilar microhematocrit heparinizat. Volumele de sânge variază de la 5 la 15 µl în funcție de dimensiunile peștilor. În tubul microcapilar se adaugă un volum egal de tampon de aprotinină (6 µgml în PBS), iar plasma este separată de sânge prin centrifugare (5 minute la 600 g). Plasma este colectată în tuburi de testare și depozitată la o temperatură de – 20 °C până în momentul măsurării vitelogeninei sau a altor proteine care prezintă interes.

Procedura 3 B: Peștele-zebră, prelevare de sânge prin puncție cardiacă

Pentru a se evita coagularea sângelui și degradarea proteinelor, probele sunt colectate într-o soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) conținând heparină (1 000 unități/ml) și aprotinină – inhibitoare de protează (2 TIU/ml). Ca ingrediente pentru tampon se recomandă, sare de amoniu a heparinei și aprotinină liofilizată. Pentru prelevarea de probe de sânge se recomandă utilizarea unei seringi (1 ml) cu un ac subțire fix (de exemplu, Braun Omnikan-F). Seringa trebuie preumplută cu tampon (aproximativ 100 µl) pentru a realiza o eluare completă a volumelor sanguine mici de la fiecare pește. Probele de sânge sunt prelevate prin puncție cardiacă. Peștele trebuie anesteziat în prealabil cu MS-222 (100 mg/l). Un plan de anestezie corespunzător este acela care permite utilizatorului să distingă bătăile inimii peștelui-zebră. În timpul efectuării puncției cardiace, aplicați o tensiune ușoară continuă pe pistonul seringii. Volumele sanguine care pot fi colectate se încadrează în intervalul 20-40 de microlitri. După efectuarea puncției cardiace, amestecul de sânge și soluție tamponată trebuie introdus într-un tub de testare. Plasma este separată de sânge prin centrifugare (20 de minute; 5 000 g) și trebuie depozitată la o temperatură de – 80 °C până în momentul efectuării analizei.

Procedura 3C: POS: Peștele-zebră, omogenizarea capului și a cozii

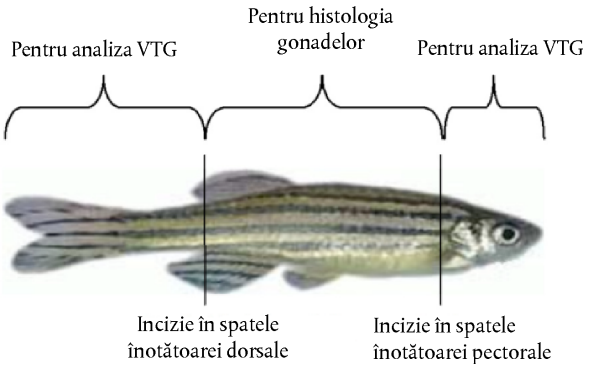
(1) Peștii sunt anesteziați și eutanasiați conform descrierii testului.

(2) Capul și coada peștelui sunt tăiate conform Figurii 1.

Important: Toate instrumentele de disecție și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu vitelogenină” de la femele sau de la masculii induși la masculii neinduși.

▼**M6**

Figura 1



(3) Greutatea materialului conținând cap și coadă de la fiecare pește este măsurată, rotunjindu-se greutatea la cea mai apropiată cifră întreagă în mg.

(4) După cântărire, părțile sunt introduse în tuburi corespunzătoare (de exemplu, 1,5 ml Eppendorf) și congelate la o temperatură de – 80 °C până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață, iar rezultatul este o masă omogenă). Important: Tuburile trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de trup corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor.

(5) Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă tampon de omogenizare (*) la temperatura gheții în greutate 4 × greutatea țesutului. Se continuă operațiunea cu ajutorul pistilurilor până ce amestecul devin omogen. Notă importantă: se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.

(6) Probele se plasează pe gheață până la centrifugare, care se realizează la 4 °C la 50 000 × g timp de 30 min.

(7) Se utilizează o pipetă pentru a repartiza câte 20 µl de supernatant în cel puțin două tuburi introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără nicio fracțiune de grăsime sau de granule.

(8) Tuburile se depozitează la – 80 °C până la utilizare.

(*) **Tampon de omogenizare:**

— [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl amestec de inhibitori de protează.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), de exemplu de la Bie & Berntsen, Danemarca.

— Amestec de inhibitori de protează: de la Sigma (pentru țesut de mamifer) Numărul produsului P 8340.

— *Notă:* tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării.

▼**M6**

Apendicele 7

Probe fortificate de vitelogenină și standard de referință interteste

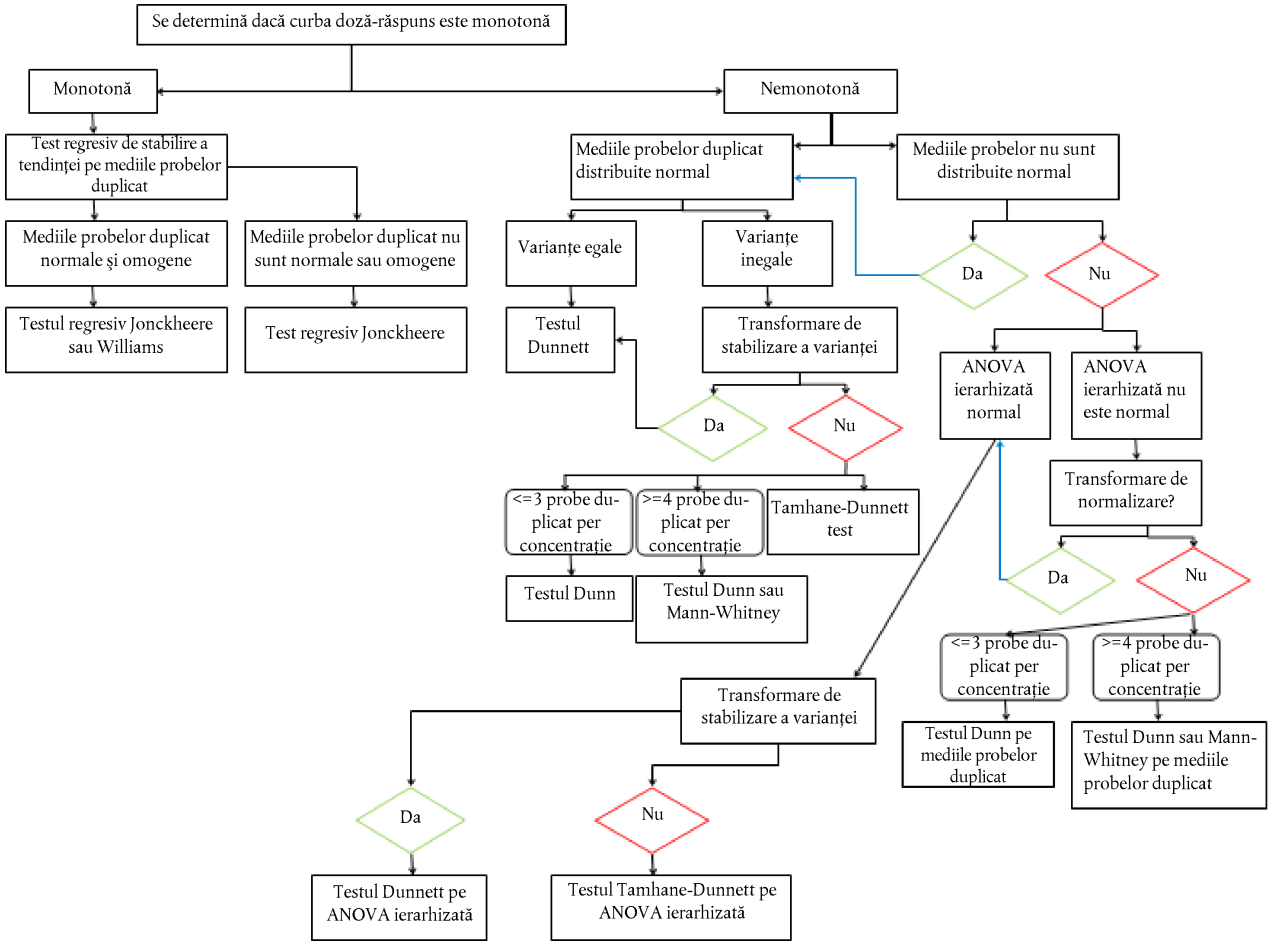
De fiecare dată când sunt efectuate teste de măsurare a vitelogeninei, va fi analizată o probă fortificată obținută cu ajutorul unui standard de referință interteste. Vitelogenina utilizată pentru prepararea standardului de referință interteste va proveni de la un lot diferit de cel utilizat pentru prepararea standardelor de calibrare pentru testul care urmează să fie realizat.

Proba fortificată va fi preparată prin adăugarea unei cantități cunoscute de standard interteste la o probă de plasmă de mascul de control. Proba va fi fortificată pentru a obține o concentrație de vitelogenină între de 10 și de 100 de ori mai mare față de concentrația de vitelogenină preconizată pentru peștii masculi de control. Proba de plasmă de masculi de control care este fortificată poate proveni de la un singur pește sau poate fi un amestec de la mai mulți pești.

Un subeșantion de plasmă nefortificată de mascul de control va fi analizat în cel puțin două godeuri duplicat. Proba fortificată va fi, de asemenea, analizată în cel puțin două godeuri duplicat. Cantitatea medie de vitelogenină din cele două probe de plasmă nefortificate de mascul de control va fi adăugată la cantitatea calculată de vitelogenină adăugată la probele fortificate în vederea determinării concentrației preconizate. Raportul dintre respectiva concentrație preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

▼M6

Apendicele 8



▼M6

C.38. TEST DE METAMORFOZĂ LA AMFIBIENI

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 231 (2009). Necesitatea creării și validării unui test care să aibă capacitatea de a detecta substanțele chimice active asupra sistemul tiroidian al speciilor vertebrate reprezintă o consecință a temerilor conform cărora concentrațiile din mediu ale substanțelor chimice pot cauza efecte adverse atât oamenilor, cât și faunei. În 1998, OCDE a inițiat o activitate, cu prioritate mare, de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări vizând screeningul și testarea unor factori perturbatori potențiali ai sistemului endocrin. Un element al activității a constat în dezvoltarea unei orientări vizând screeningul substanțelor active asupra sistemului tiroidian al speciilor vertebrate. Au fost propuse atât o variantă perfecționată a studiului toxicității orale, cu doze repetate, cu durată de 28 de zile, la rozătoare (capitolul B.7 din prezenta anexă) și testul de metamorfoză la amfibieni (*Amphibian Metamorphosis Assay* – AMA). Metoda de testare B.7 în varianta ei perfecționată a fost supusă validării și a fost emisă o metodă de testare revizuită. Testul de metamorfoză la amfibieni (AMA) a făcut obiectul unui amplu program de validare care a inclus studii intra- și interlaboratoare demonstrând relevanța și fiabilitatea testului (1, 2). Ulterior, validarea testului a făcut obiectul unei evaluări *inter pares* efectuate de un grup de experți independenți (3). Această metodă de testare reprezintă rezultatul experienței dobândite pe parcursul studiilor de validare pentru detectarea substanțelor chimice active asupra sistemului tiroidian și al activității desfășurate în alte părți, în țările membre ale OCDE.

PRINCIPIUL TESTULUI

2. Testul de metamorfoză la amfibieni (AMA) este un test de screening care are ca obiectiv identificarea pe bază empirică a substanțelor chimice care pot interfera cu funcționarea normală a axului hipotalamo-hipofizo-tiroidian (HHT). AMA reprezintă un model generalizat pentru vertebrate în măsura în care se bazează pe structurile și funcțiile conservate ale axului HHT. Acesta este un test important deoarece metamorfoza la amfibieni oferă un proces bine studiat, dependent de tiroidă, care răspunde la substanțele chimice active din axul HHT, fiind singurul test în măsură să detecteze activitatea tiroidiană la animalele care sunt în cursul unei dezvoltări morfologice.

3. Protocolul experimental general implică expunerea mormolocilor de *Xenopus laevis* aflați în stadiul 51 la minimum trei concentrații diferite ale unei substanței chimice testate și la un control reprezentat de apa diluată, timp de 21 de zile. Există patru replici ale fiecărui tratament de testare. Densitatea larvară la inițierea testului este de 20 de mormoloci per bazin de testare pentru toate grupele tratate. Parametrii studiați observați sunt lungimea membrelor posterioare, lungimea bot-cloacă (*snout to vent length* – SVL), stadiul de dezvoltare, greutatea umedă, histologia tiroidiană și observațiile zilnice ale mortalității.

DESCRIEREA METODEI

Speciile folosite pentru testare

4. *Xenopus laevis* este crescut în mod uzual în condiții de laborator în întreaga lume, fiind ușor de obținut prin intermediul furnizorilor comerciali. Reproducerea poate fi indusă cu ușurință în cazul acestei specii pe parcursul întregului an utilizând injecții cu gonadotropină corionică umană (*human chorionic gonadotropin* – HCG), larvele rezultate putând fi crescute ușor până la stadii de dezvoltare selectate, în număr mare,

▼M6

pentru a permite utilizarea de protocoale de testare specifice stadiilor. Este de preferat ca larvele utilizate în test să derive din adulți crescuți în propriul laborator. Ca alternativă, deși nu este procedura preferată, ouăle sau embrionii pot fi expediați la laboratorul care efectuează testul, unde li se permite aclimatizarea; expedierea organismelor în stadiu de larvă în scopuri de testare nu este acceptabilă.

Echipament și materiale

5. Următoarele echipamente și materiale sunt necesare pentru realizarea acestui test:

a) Sistem de expunere (a se vedea descrierea de mai jos);

b) Acvarii din sticlă sau din oțel inoxidabil (a se vedea descrierea de mai jos);

c) Bazine de reproducere;

d) Aparat de controlare a temperaturii [de exemplu aparate de încălzire sau aparate de răcire (ajustabile la 22° ± 1 °C)];

e) Termometru;

f) Microscop de disecție binocular;

g) Cameră digitală cu o rezoluție de cel puțin 4 megapixeli și cu funcție micro;

h) Software pentru digitalizarea de imagini;

i) Placă Petri (ex. 100 × 15 mm) sau o cameră transparentă din plastic de dimensiuni comparabile;

j) Balanță analitică capabilă să măsoare greutatea cu 3 zecimale (mg);

k) Aparat pentru măsurarea oxigenului dizolvat;

l) pH-metru;

m) Aparat pentru măsurat intensitatea luminii în unități lux;

n) Diverse vase din sticlă și instrumente de laborator;

o) Pipete ajustabile (10 – 5 000 µl) sau pipete asortate de dimensiuni echivalente;

p) Substanță chimică utilizată în testare, în cantități suficiente pentru realizarea studiului, de preferat dintr-un singur lot;

q) Instrumente analitice corespunzătoare pentru substanța chimică utilizată în testare sau servicii analitice contractate.

Posibilitatea ca substanța chimică să fie utilizată în test

6. AMA se bazează pe un protocol de expunere în mediu acvatic, în cadrul căruia substanța chimică este introdusă în incintele de testare prin intermediul unui sistem de testare cu flux continuu. Cu toate acestea, metodele testare cu flux continuu sunt supuse unor constrângeri legate de tipul substanțelor chimice care pot fi testate, în funcție de proprietățile lor fizico-chimice. Prin urmare, înainte de utilizarea acestui protocol, este necesară obținerea de informații de referință privind substanța chimică în cauză pentru a determina posibilitatea ca substanța chimică să fie utilizată în test, precum și consultarea publicației „*OECD Guidance Document on*

▼M6

Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures" (Document de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile) (4). Caracteristicile care indică faptul că substanța chimică poate fi dificil de testat în sisteme acvatice includ: coeficienții de partiționare apă/octanol (log K_{ow}) mari, volatilitate mare, susceptibilitatea la hidroliză și la fotoliză în condiții de iluminat de laborator. De asemenea, alți factori pot fi relevanți pentru determinarea posibilității ca substanța chimică să fie utilizată în test, iar aceștia trebuie determinați pentru fiecare caz în parte. Dacă utilizarea unui sistem de testare cu flux continuu nu permite succesul în testarea substanței chimice, este posibil să se recurgă la un sistem static cu reînnoire. În cazul în care niciunul dintre sisteme nu este adaptat pentru substanța chimică testată, atunci aceasta nu se testează prin acest protocol.

Sistemul de expunere

7. Un sistem de diluție cu flux continuu este preferabil, dacă este posibil, unui sistem static cu reînnoire. Dacă proprietățile fizice și/sau chimice ale oricăreia dintre substanțele chimice nu permit utilizarea unui sistem de diluție cu flux continuu, se poate utiliza un sistem de expunere alternativ (de exemplu, static cu reînnoire). Componentele sistemului trebuie să fie fabricate dintr-un material adaptat pentru contactul cu apa, precum sticla, oțelul inoxidabil și/sau politetrafluoretilena. Cu toate acestea, pot fi utilizate materiale plastice corespunzătoare dacă acestea nu compromit studiul. Bazinele de expunere trebuie să fie acvarii din sticlă sau oțel inoxidabil, prevăzute cu conducte verticale care să mențină volumul aproximativ al bazinului între 4 și 10 l și o adâncime minimă a apei de 10 – 15 cm. Sistemul trebuie să aibă capacitatea de a susține toate concentrațiile de expunere și un control, cu patru replici per tratament. Debitul fiecărui bazin trebuie să fie constant, luând în considerare menținerea condițiilor biologice și expunerea la substanța chimică (ex. 25 ml/min). Bazinele de tratament trebuie să fie dispuse aleator într-o anumită poziție în cadrul sistemului de expunere, pentru a reduce eventualele efecte legate de poziție, inclusiv variațiile ușoare ale temperaturii, intensității luminii etc. Iluminarea fluorescentă trebuie să fie utilizată pentru a asigura o perioadă de expunere la lumină de 12 h de lumină: 12 h de întuneric la o intensitate cuprinsă între 600 și 2 000 lux (lumen/m^2) la suprafața apei. În fiecare bazin de testare, temperatura apei trebuie menținută la 22° ± 1 °C, pH-ul trebuie menținut la valori cuprinse între 6,5 și 8,5, iar concentrația oxigenului dizolvat (OD) la > 3,5 mg/l (> 40 % din saturația în aer). Ca o condiție minimă, temperatura apei, pH-ul și oxigenul dizolvat trebuie măsurate săptămânal; temperatura trebuie să fie măsurată, de preferință, în mod continuu în cel puțin unul dintre vasele de testare. Apendicele 1 schițează condițiile experimentale necesare executării protocolului. Pentru informații suplimentare privind instalare sistemelor de expunere cu flux continuu și/sau a celor statice cu reînnoire, a se consulta ghidul ASTM „*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*" (Orientare-standard privind efectuarea testelor de toxicitate acută cu materiale de testare pe pești, macronevertebrate și amfibieni) (5) și testele de toxicologie acvatică generale.

Calitatea apei

8. Poate fi utilizată orice apă disponibilă local (apa de izvor sau apa de la robinet filtrată cu filtru de carbon) și care permite creșterea și dezvoltarea normale ale mormolocilor de *X. laevis*. Întrucât calitatea apei locale poate varia în mod semnificativ de la o zonă la alta, trebuie efectuată o analiză a calității apei, în special dacă nu sunt disponibile date istorice privind utilitatea respectivei ape pentru creșterea de *Xenopus*. O atenție specială trebuie acordată confirmării absenței din apă a cuprului, a clorului și a cloraminelor, toate acestea fiind toxice pentru broaște și mormoloci. În plus, se recomandă să se analizeze apa în ceea ce privește concentrațiile

▼M6

de fond de fluoruri, perclorați și cloraţi (subproduse rezultate din dezinfectarea apei potabile), întrucât toți acești anioni sunt substraturi ale transportatorului iodului la glanda tiroidă, iar nivelurile ridicate ale acestora pot perturba rezultatele studiului. Analiza trebuie să fie efectuată înainte de începerea testării, iar apa de testare trebuie în mod normal să nu conțină acești anioni.

Concentrația de ioduri din apa de testare

9. Sinteza hormonilor tiroidieni în glanda tiroidă se bazează pe cantități suficiente de ioduri aflate la dispoziția larvelor, din surse acvatice și alimentare. În prezent, nu există recomandări empirice privind concentrațiile de ioduri minime. Cu toate acestea, cantitățile de ioduri disponibile pot afecta reactivitatea sistemului tiroidian la agenții activi asupra tiroidei, un factor de altfel cunoscut ca influențând activitatea bazală a acestei glande, un aspect care trebuie luat în considerare în momentul interpretării rezultatelor histopatologiei tiroidei. Prin urmare, trebuie raportate concentrațiile de ioduri măsurate în apa utilizată pentru testare. Pe baza datelor disponibile provenind din studiile de validare, s-a demonstrat că protocolul funcționează bine atunci când concentrațiile de ioduri (I^-) din apa de testare au fost situate între 0,5 și 10 µg/l. În mod ideal, concentrația minimă de ioduri din apa de testare trebuie să fie de 0,5µg/l. Dacă testul este efectuat cu apă deionizată, pentru a atinge această concentrație minimă de 0,5µg/l este necesară suplimentare cu iod. Orice altă suplimentare a apei de testare cu iod sau cu alte săruri trebuie notată în raport.

Îngrijirea animalelor

Îngrijirea și reproducerea animalelor adulte

10. Îngrijirea și reproducerea animalelor adulte este realizată în conformitate cu orientările standard, iar pentru informații mai detaliate, cititorul este invitat să consulte orientările standard privind efectuarea testului intitulat „*Frog Embryo Teratogenesis Assay (FETAX)*” (Testul de teratogeneză la embrionii de broască) (6). Aceste orientări standard oferă un exemplu de metode de îngrijire și de reproducere adecvate, însă fără să fie necesară respectarea loc cu strictețe. Pentru a induce reproducerea, mai multe cupluri (3 – 5) de adulți, femele și masculi, sunt injectate cu gonadotropină corionică umană (HCG). Dozele injectate femelelor și masculilor sunt de aproximativ 800 IU – 1 000 IU și, respectiv, la 600 IU – 800 IU de HCG dizolvată într-o soluție salină de 0,6 – 0,9 %. Cuplurile reproducătoare sunt ținute în bazine de mari dimensiuni, ferite de perturbări și în condiții statice, în vederea promovării amplexusului. Fundul fiecărui bazin de reproducere este prevăzut cu un grilaj din plastic sau din oțel inoxidabil, care să permită maselor de ouă să cadă pe fundul bazinului. Broaștele injectate după-amiaza târziu vor depune, de obicei, cea mai mare parte a ouălor pe la jumătatea dimineții zilei următoare. După ce o cantitate suficientă de ouă sunt eliberate și fertilizate, adulții trebuie să fie îndepărtați din bazinele de reproducere.

Îngrijirea și selectarea larvelor

11. După ce adulții sunt îndepărtați din bazinele de reproducere, ouăle sunt colectate și evaluate din punctul de vedere al viabilității lor, utilizându-se un subset de embrioni prelevați din toate bazinele de reproducere. Cele mai bune progenituri (2 – 3 sunt recomandate pentru evaluarea calității lor) trebuie reținute pe baza viabilității embrionilor și a prezenței unui număr adecvat (minimum 1 500) de embrioni. Toate organismele utilizate în cadrul unui studiu trebuie să provină dintr-un singur eveniment de reproducere (progeniturile nu trebuie amestecate). Embrionii sunt transferați într-un recipient sau vas mare și plat și toate ouăle vizibil moarte sau anormale [a se vedea definiția de la (5)] sunt îndepărtate cu ajutorul unei pipete sau al unei pipete oculare. Embrionii sănătoși rezultați din

▼**M6**

fiecare set de progenituri sunt transferați în trei bazine de eclozare separate. La patru zile după transferare în bazinele de eclozare se selectează, pe baza viabilității și a succesului eclozării, cele mai bune progenituri, iar larvele sunt transferate într-un număr corespunzător de bazine de creștere la 22° ±1 °C. În plus, alte larve sunt mutate în bazine suplimentare pentru a servi ca înlocuitori în caz de mortalitate în bazinele de creștere pe parcursul primei săptămâni. Această procedură menține o densitate constantă de organisme, ceea ce reduce divergența dezvoltării în cohorta provenită dintr-un singur eveniment de reproducere. Toate bazinele de creștere trebuie să fie curățate zilnic. Ca măsură de precauție, mănușile de vinil sau de nitril sunt preferabile mănușilor din latex. Organismele moarte trebuie să fie îndepărtate zilnic și înlocuite cu larve pentru a menține astfel densitatea organismelor la un nivel constant pe parcursul primei săptămâni. Larvele trebuie hrănite cel puțin de două ori pe zi.

12. Pe parcursul etapei de preexpunere, mormolocii sunt aclimatizați la condițiile corespunzătoare etapei de expunere, inclusiv la tipul de hrană, la temperatură, la ciclul lumină-întuneric și la mediul de cultură. Prin urmare, se recomandă ca aceeași apă de cultură/diluție să fie utilizată pe parcursul etapei de preexpunere și al celei de expunere. Dacă un sistem de cultură static este utilizat pentru menținerea mormolocilor pe durata etapei de preexpunere, mediul de cultură trebuie să fie înlocuit complet cel puțin de două ori pe săptămână. Suprapopularea, cauzată de densitățile mari de larve din cursul etapei de preexpunere, trebuie evitată deoarece un astfel de fenomen ar putea afecta în mod semnificativ dezvoltarea mormolocilor în cursul fazei de testare care urmează. Prin urmare, densitatea din bazinul de creștere nu trebuie să depășească aproximativ patru mormoloci/l de mediu de cultură (sistem de expunere statică) sau 10 mormoloci/l de mediu de cultură (de exemplu, cu un debit de 50 ml/min în sistemul de cultură sau de preexpunere). În aceste condiții, mormolocii trebuie să se dezvolte de la stadiul 45/46 la stadiul 51 în doisprezece zile. Mormolocii reprezentativi ai acestei populații trebuie inspectați zilnic pentru a observa stadiul de dezvoltare în vederea estimării timpului corespunzător pentru începerea expunerii. Trebuie procedat cu atenție pentru a minimaliza stresul și traumele pentru mormoloci, în special în timpul mobilizării, al curățării acvariilor și al manipulării larvelor. Condițiile/activitățile stresante trebuie evitate, în special zgomotele puternice și/sau constante, vibrațiile și lovirea acvariilor, activitatea excesivă în laborator și modificări rapide ale mediului (lumina, temperatura, pH-ul, OD, debitul apei, etc.). Dacă mormolocii nu ajung în stadiul 51 în decurs de 17 zile de la fertilizare, stresul excesiv trebuie considerat ca fiind una dintre cauze.

Cultura și hrănirea larvelor

13. Mormolocii sunt hrăniți de exemplu cu hrană comercială pentru mormoloci utilizată în studiile de validare (a se vedea, de asemenea, apendicele 1) pe parcursul etapei de preexpunere [conform stadiului Nieuwkoop și Faber (NF) 45/46 (8)] și pe parcursul întregii perioade de testare de 21 de zile sau cu alt tip de hrană care a demonstrat aceeași performanță în cadrul testului de metamorfoză la amfibieni. Regimul de hrănire pe parcursul perioadei de preexpunere trebuie să fie ajutat cu atenție pentru a îndeplini necesitățile mormolocilor în dezvoltare. În practică, de mai multe ori pe zi (de cel puțin două ori), porții mici de hrană trebuie administrate larvelor recent eclozate. Hrănirea în exces trebuie evitată în vederea *i)* menținerea calității apei și *ii)* a prevenirii depunerii pe filtrelor branhiilor de particule și resturi de hrană. În ceea ce privește hrana administrată mormolocilor în studiile de validare, porțiile zilnice trebuie crescute pe măsura creșterii mormolocilor până la atingerea unei cantități de aproximativ 30 mg/animal/zi cu puțin timp înainte de începerea testului. În studiile de validare s-a demonstrat că hrana disponibilă

▼M6

comercial susține creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a mormolocilor de *X. laevis* și că este o masă de particule fine care rămân suspendate în coloana de apă timp îndelungat și sunt îndepărtate odată cu fluxul apei. Prin urmare, volumul zilnic total de hrană trebuie împărțit în porții mai mici și administrate zilnic de cel puțin două ori. Pentru acest tip de hrană, regimul de hrănire este prezentat în tabelul 1. Ritmul de hrănire trebuie înregistrat. Acest tip de hrană poate fi administrat sub formă uscată sau sub formă de soluție stoc pregătită în apă de diluție. O astfel de soluție stoc trebuie pregătită proaspăt la un interval de două zile și depozitată la 4 °C atunci când nu este utilizată.

Tabelul 1

Regimul de hrănire cu hrană comercială pentru mormoloci utilizată în studiile de validare pentru mormolocii de *X. laevis* în etapa în care animalele sunt în viață în cursul AMA în condiții de flux continuu

Ziua studiului	Porția de hrană (mg de hrană/animal/zi)
0 – 4	30
5 – 7	40
8 – 10	50
11 – 14	70
15 – 21	80

Chimie analitică

14. Înainte de efectuarea unui studiu, stabilitatea substanței chimice testate ar trebui evaluată utilizând informațiile existente referitoare la solubilitatea, degradabilitatea și volatilitatea sa. Soluțiile de testat din fiecare bazin replică la fiecare concentrație ar trebui eșantionate pentru analize de chimie analitică la începerea testării (ziua 0) și săptămânal pe durata testării, cu un minimum de patru eșantioane. De asemenea, se recomandă ca fiecare concentrație de testare să fie analizată pe durata pregătirii sistemului, înainte de începerea testării, în vederea verificării performanței sistemului. În plus, se recomandă ca soluțiile stoc să fie analizate atunci când sunt modificate, în special dacă volumul soluției stoc nu furnizează cantități corespunzătoare de substanțe chimice pentru a acoperi durata perioadelor de eșantionare de rutină. În cazul substanțelor chimice care nu pot fi detectate la anumite concentrații sau la toate concentrațiile utilizate într-o testare trebuie măsurate soluțiile stoc și trebuie înregistrate debitele sistemului pentru a calcula concentrațiile nominale.

Livrarea substanței chimice

15. Metoda utilizată pentru a introduce substanța chimică testată în sistem poate varia în funcție de proprietățile sale fizico-chimice. Substanțele chimice solubile în apă pot fi dizolvate în alicote de apă de testare la o concentrație care permite livrarea la concentrația de testare vizată în cadrul unui sistem cu flux continuu. Substanțele chimice care sunt lichide la temperatura camerei și greu solubile în apă pot fi introduse cu ajutorul metodelor care implică o saturare lichid:lichid. Substanțele chimice care sunt solide la temperatura camerei și greu solubile în apă pot fi introduse cu ajutorul unor coloane de saturare cu vată de sticlă (7). Se preferă utilizarea unui sistem de testare fără cărăuși, totuși, diferitele substanțe chimice testate vor avea proprietăți fizico-chimice diferite care probabil

▼M6

vor necesita diferite abordări pentru pregătirea apei de expunere la substanțe chimice. Este de preferat să se depună eforturi pentru a evita solvenții sau cărăușii deoarece: *i)* anumiți solvenți pot fi ei înșiși toxici și/sau pot induce răspunsuri endocrinologice nedorite sau neașteptate, *ii)* testarea substanțelor chimice în concentrații care depășesc solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent în cazul solvenților) pot conduce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective și *iii)* utilizarea solvenților în teste cu o durată mai lungă poate conduce la un grad semnificativ de formare de „biofilme” asociat cu activitatea microbiană. În ceea ce privește substanțele chimice care sunt dificil de testat, trebuie utilizat, în ultimă instanță, un solvent și trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (4) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice. Solvenții care s-au dovedit eficienți pentru testarea toxicității acvatice includ acetona, etanolul, metanolul, dimetilformamida și trietilenglicolul. În cazul în care este utilizat un solvent-cărăuș, concentrațiile solventului trebuie să fie sub concentrația fără efecte observabile (*No Observed Effect Concentration* – NOEC) cronică; documentul de orientare al OCDE recomandă un maximum de 100µl/l; o examinare recentă recomandă utilizarea de concentrații ale solvenților de maximum 20µl/l în apa de diluție (12). În cazul în care sunt utilizați solvenți-cărăuși, trebuie evaluate controalele cu solvent adecvate în plus față de controalele fără solvent (apă curată). În cazul în care nu este posibilă administrarea unei substanțe chimice cu ajutorul apei, fie din cauza caracteristicilor fizico-chimice (solubilitate mică) sau disponibilitate limitată a substanței chimice, poate fi luată în considerare introducerea acesteia prin alimentație. Au fost efectuate activități preliminare privind expunerile prin hrană; totuși, această rută de expunere nu este utilizată frecvent. Alegerea metodei trebuie documentată și verificată în mod analitic.

Selectarea concentrațiilor de testare

Stabilirea concentrației de testare mari

16. În scopul acestei testări, concentrația de testare mare trebuie stabilită de limita de solubilitate a substanței chimice testate; concentrația maximă tolerată (*maximum tolerated concentration* – MTC) pentru substanțele chimice cu toxicitate acută; sau 100 mg/l, oricare este concentrația cea mai mică.

17. MTC este definită drept cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice care determină o mortalitate acută de sub 10 %. Utilizarea acestei metode presupune faptul că există date empirice privind mortalitatea acută pe baza cărora poate fi estimată MTC. Estimarea MTC poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită judecată profesională. Cu toate că utilizarea de modele de regresie poate fi cea mai bună abordare din punct de vedere tehnic pentru a estima MTC, o aproximare utilă a MTC poate fi obținută din datele existente privind toxicitatea acută utilizând 1/3 din valoarea LC_{50} acute. Totuși, datele privind toxicitatea acută pot lipsi în cazul speciilor testate. În cazul în care nu sunt disponibile date specifice privind toxicitatea acută pentru specii, poate fi efectuat un test LC_{50} de 96 de ore cu mormoloci reprezentativi (adică, în același stadiu) pentru cei testați în cadrul AMA. În mod opțional, în cazul în care sunt disponibile date privind alte specii acvatice (ex., studii LC_{50} la pești și alte specii de amfibieni), judecata profesională poate fi utilizată pentru a estima o MTC probabilă pe baza extrapolării inter-specii.

18. În mod alternativ, în cazul în care substanța chimică nu este toxică în mod acut și este solubilă la peste 100 mg/l, atunci valoarea de 100 mg/l ar trebui considerată concentrația de testare cea mai mare (*highest test concentration* – HTC), deoarece această concentrație este considerată în mod tipic ca fiind „practic netoxică”.

▼**M6**

19. Deşi nu este procedura recomandată, metode statice cu reînnoire pot fi utilizate în cazurile în care metodele cu flux continuu nu sunt adecvate pentru a obține MTC. În cazul în care sunt utilizate metode statice cu reînnoire, stabilitatea concentrației substanței chimice testate trebuie documentată și trebuie să rămână în limitele criteriilor privind performanța. Sunt recomandate perioade de reînnoire de douăzeci și patru de ore. Perioadele de reînnoire care depășesc 72 de ore nu sunt acceptabile. În plus, parametrii privind calitatea apei (OD, temperatură, pH, etc.) trebuie măsurați la sfârșitul fiecărei perioade de reînnoire, imediat înainte de reînnoire.

Intervalul de concentrații de testare

20. Este necesar un număr *minim* de trei concentrații de testare și un control cu apă curată (și un control cu vehicul, dacă este necesar). Diferența minimă a concentrației de testare între cea mai mare și cea mai mică trebuie să fie de aproximativ un ordin de mărime. Separarea maximă a dozei este de 0,1 și cea minimă este de 0,33.

PROCEDURA

Începerea și realizarea testului

Ziua 0

21. Expunerea trebuie începută în momentul în care un număr suficient de mormoloci din populația stocului de preexpunere a atins stadiul de dezvoltare de 51, conform Nieuwkoop și Faber (8), și care au vârsta mai mică sau egală cu 17 zile după fertilizare. Pentru selectarea animalelor de testare, mormoloci sănătoși și cu aspect normal din cadrul populației stoc trebuie comasați într-un singur vas care să conțină un volum corespunzător de apă de diluție. Pentru determinarea stadiului de dezvoltare, mormolocii trebuie să fie îndepărtați în mod individual din bazinul de în care au fost comasați, cu ajutorul unei mici plase sau strecurători și trebuie transferați într-un spațiu de măsurare transparent (de exemplu, placă Petri de 100 mm) care conține apă de diluție. Pentru determinarea stadiului, este preferabil să nu se recurgă la anestezie, însă mormolocii pot fi anesteziați individual utilizând 100 mg/l de metansulfonat de tricaină (de exemplu, MS-222), tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu (pH 7) înainte de manipulare. Dacă este utilizată, metodologia de utilizare corespunzătoare, de exemplu a MS-222, pentru anestezie trebuie obținută de la laboratoare experimentate și raportată împreună cu rezultatele testului. Animalele trebuie să fie manipulate cu grijă pe durata acestui transfer pentru a minimaliza stresul cauzat de manipulare și pentru a evita orice leziune.

22. Stadiul de dezvoltare al animalelor este determinat cu ajutorul un microscop de disecție binocular. Pentru a reduce variabilitatea ultimă în stadiul de dezvoltare, este important ca determinarea stadiului să fie realizată cât mai exact posibil. Conform Nieuwkoop și Faber (8), reperul principal care indică stadiul de dezvoltare utilizat pentru selectarea organismelor din stadiul 51 este morfologia membrelor posterioare. Caracteristicile morfologice ale membrelor posterioare trebuie să fie examinate la microscop. Dacă pentru informații complete privind determinarea stadiului mormolocilor trebuie să se consultate ghidul Nieuwkoop și Faber (8), stadiul poate fi determinat în mod fiabil utilizând reperele morfologice majore. Tabelul de mai jos poate fi utilizat pentru a simplifica și pentru a standardiza procesul de determinare a stadiului pe întreaga durată a studiului prin identificarea acelor repere morfologice majore care sunt asociate unor diferite stadii, presupunând că dezvoltarea este normală.

▼M6

Tabelul 2

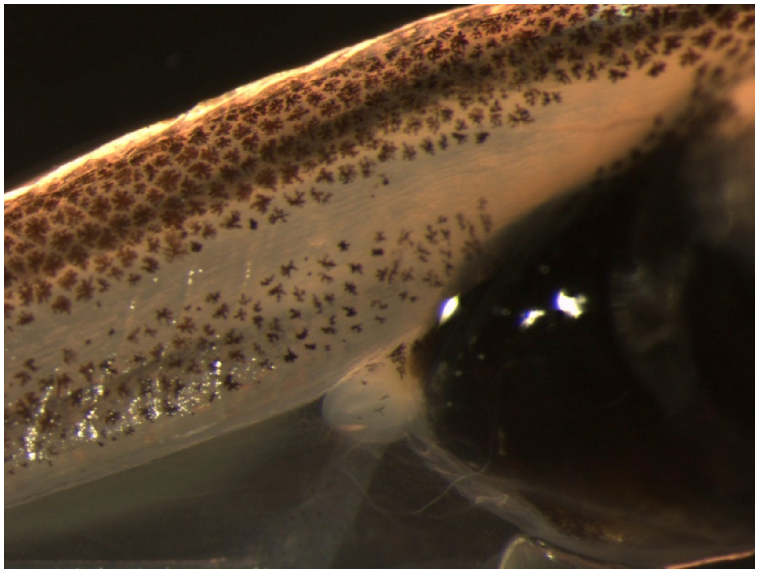
Repere morfologice majore de stadializare conform ghidului Neuwkoop și Faber.

Repere morfologice majore	Stadiu de dezvoltare															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Membre posterioare	X	X	X	X	X	X	X									
Membre anterioare						X	X	X	X	X						
Structura craniofacială										X	X	X	X			
Morfologia nervului olfactiv											X	X	X			
Lungimea cozii													X	X	X	X

23. Pentru începerea testului, toți mormolocii trebuie să fie în stadiul 51. Cel mai important reper morfologic major de stadializare pentru stadiul respectiv este morfologia membrelor posterioare, care este demonstrată în Figura 1.

Figura 1

Morfologia membrelor posterioare a unui mormoloc *X. laevis* în stadiul 51.



24. În plus față de selectarea stadiului de dezvoltare, poate fi folosită selectarea opțională a dimensiunii animalelor utilizate în scopuri experimentale. În acest scop, lungimea corpului întreg (nu SVL) trebuie măsurată în ziua 0 pentru un subeșantion de aproximativ 20 de mormoloci aflați în stadiul 51 conform NF. După calcularea mediei lungimii corpului întreg pentru acest grup de animale, limitele minimă și maximă pentru lungimea corpului întreg a animalelor utilizate în scopuri experimentale pot fi stabilite permițând un interval al valorii medii de ± 3 mm (valorile medii ale lungimii corpului întreg sunt cuprinse între 24 și 28,1 mm pentru mormolocii în stadiul 51). Cu toate acestea, determinarea stadiului de dezvoltare constituie parametrul principal în a determina dacă fiecare animal este gata de testare. Mormolocii care prezintă malformații sau leziuni vizibile macroscopic trebuie excluși de la testare.

▼M6

25. Mormolocii care îndeplinesc criteriile de stadializare descrise mai sus sunt ținuți într-un bazin cu apă curată de cultură până la finalizarea procesului de determinare a stadiului. După finalizarea procesului de determinare a stadiului, larvele sunt distribuite în mod aleatoriu în bazinele de tratament de expunere până când fiecare bazin conține 20 de larve. Fiecare bazin de tratament este ulterior inspectat pentru a detecta animale cu aspect anormal (de exemplu, leziuni, comportament de înot anormal, etc.). Mormolocii cu un aspect evident nesănătos trebuie îndepărtați din bazinele de tratament și înlocuiți cu larve nou selectate din bazinul de comasare.

Observații

26. Pentru informații mai aprofundate privind procedurile de terminare a testării și prelucrarea mormolocilor, a se consulta „*OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*" (Document de orientare al OCDE privind histologia tiroidei amfibienilor) (9).

Ziua 7 Măsurători

27. În ziua 7, cinci mormoloci aleși în mod aleatoriu per replică sunt îndepărtați din fiecare bazin de testare. Procedura de selectare aleatorie utilizată trebuie să confere fiecărui organism testat o probabilitate egală de a fi selectat. Aceasta se poate realiza prin utilizarea oricărei metode de randomizare, însă necesită ca fiecare mormoloc să fie prins. Mormolocii neselectați sunt transferați înapoi în bazinul de origine, iar mormolocii selectați sunt eutanasiați fără cruzime excesivă în 150 – 200 mg/l MS-222 tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu pentru a se obține pH 7. Mormolocii eutanasiați sunt clătiți cu apă și uscați prin tamponare, proces urmat de determinarea greutății corporale cu rotunjire la cel mai apropiat miligram. Lungimea membrelor posterioare, lungimea bot-cloacă și stadiul de dezvoltare sunt determinate pentru fiecare mormoloc (cu ajutorul unui microscop de disecție binoculară).

Ziua 21 Măsurători (încheierea testului)

28. În momentul încheierii testului (ziua 21), mormolocii rămași sunt îndepărtați din bazinele de testare și eutanasiați fără cruzime excesivă în 150 – 200 mg/l MS-222 tamponată în mod corespunzător cu bicarbonat de sodiu, astfel cum se descrie mai sus. Mormolocii sunt clătiți cu apă și uscați prin tamponare, proces urmat de determinarea greutății corporale cu rotunjire la cel mai apropiat miligram. Stadiul de dezvoltare, SVL și lungimile membrelor posterioare sunt măsurate pentru fiecare mormoloc.

29. Toate larvele sunt plasate în soluție de fixare Davidson timp de 48 – 72 de ore, fie ca eșantioane de corp întreg, fie ca eșantioane fără cap conținând maxilarul inferior pentru evaluări histologice. Pentru histopatologie, trebuie prelevați din fiecare bazin replică un număr total de cinci mormoloci. Având în vedere faptul că înălțimea unei celule foliculare depinde de stadiu (10), cea mai adecvată metodă în ceea ce privește eșantionarea pentru analize histologice este, ori de câte ori este posibil, utilizarea unor indivizi aflați în stadii de dezvoltare compatibile. În vederea selectării indivizilor aflați în stadii de dezvoltare compatibile, trebuie determinat stadiul de dezvoltare a tuturor larvelor înainte de selectare și prelucrarea subsecventă în vederea colectării și conservării de date. Acest lucru este necesar deoarece divergența normală în dezvoltare va avea ca rezultat distribuții stadiale distincte în cadrul fiecărui bazin replică.

30. Animalele selectate pentru histopatologie (n = 5 din fiecare bazin replică) trebuie corelate medianei stadiului controalelor (replici comasate), ori de câte ori este posibil. În cazul în care există bazine replică în care se află mai mult de cinci larve în stadiul corespunzător, atunci cinci larve sunt selectate în mod aleatoriu.

▼M6

31. În cazul în care există bazine replică cu mai puțin de cinci larve în stadiul corespunzător, atunci indivizii selectați în mod aleatoriul din stadiul vecin de dezvoltare, inferior sau superior, trebuie să fie eșantionați pentru a constitui o dimensiune totală a eșantionului de cinci larve per replică. De preferință, decizia de a eșantiona larve suplimentare din stadiul vecin de dezvoltare, inferior sau superior, trebuie luată pe baza unei evaluări generale a distribuției stadiilor în bazinele de control și în cele cu tratament chimic. Adică, în cazul în care tratamentul chimic este asociat cu o întârziere a dezvoltării, trebuie eșantionate larve suplimentare din stadiul imediat inferior. În schimb, în cazul în care tratamentul chimic este asociat cu o accelerare a dezvoltării, trebuie eșantionate larve suplimentare din stadiul imediat superior.

32. În caz de modificări severe ale dezvoltării mormolocilor ca urmare a tratamentului cu o substanță chimică testată, ar putea să nu existe o suprapunere a distribuirii stadiilor în bazinele cu tratament chimic cu stadiul de dezvoltare median calculat în bazinele de control. Doar în aceste cazuri, procesul de selecție trebuie să fie modificat utilizând un stadiu diferit de stadiul median de control pentru a se obține o eșantionare compatibilă cu stadiul a larvelor pentru histopatologie tiroidiană. În plus, dacă stadiile sunt nedeterminate (asincronie), 5 mormoloci din fiecare replică trebuie aleși în mod aleatoriu pentru analiza histologică. Raționamentul care stă la baza eșantionării oricărei larve care nu se află într-un stadiu echivalent cu stadiul de dezvoltare median de control trebuie raportată.

Determinarea parametrilor biologici studiați

33. Pe durata fazei de expunere de 21 de zile, măsurarea principalilor parametri studiați este realizată în zilele 7 și 21, fiind necesară, totuși, observarea zilnică a animalelor testate. Tabelul 3 conține o prezentare generală a parametrilor studiați care vor fi măsurați și a momentelor de observare corespunzătoare. Informații mai detaliate privind procedurile tehnice de măsurare a parametrilor studiați apicali și evaluările histologice sunt disponibile în documentele de orientare ale OCDE (9).

Tabelul 3

Momentele de observare a principalilor parametri studiați în AMA.

Parametrii apicali	Zilnic	Ziua 7	Ziua 21
— Mortalitate	•		
— Stadiu de dezvoltare		•	•
— Lungimea membrelor posterioare		•	•
— Lungimea bot-cloacă		•	•
— Greutatea corporală umedă		•	•
— Histologia glandei tiroide			•

▼M6

Parametrii apicali

34. Stadiul de dezvoltare, lungimea membrelor posterioare, SVL și greutatea umedă sunt parametrii apicali ai AMA, fiecare fiind descris în mod succint mai jos. În documentele de orientare din referințe sunt disponibile mai multe informații tehnice referitoare la colectarea acestor date, inclusiv proceduri de analiză asistate de calculator, care sunt recomandate pentru a fi utilizate.

Stadiu de dezvoltare

35. Stadiul de dezvoltare al mormolocilor de *X. laevis* este determinat cu ajutorul criteriilor de determinare a stadiului de dezvoltare conform Nieuwkoop și Faber (8). Datele privind stadiul de dezvoltare sunt utilizate pentru a determina dacă dezvoltarea este accelerată, asincronă, întârziată sau neafectată. Accelerarea sau întârzierea dezvoltării este determinată prin compararea medianei stadiilor atinse de grupele de control și de grupele tratate. Dezvoltarea asincronă este raportată atunci când țesuturile examinate nu prezintă nicio anomalie sau malformație, însă ritmul morfogenezei sau al dezvoltării diferitelor țesuturi este perturbat la un singur mormoloc.

Lungimea membrelor posterioare

36. Diferențierea și creșterea membrelor posterioare se află sub controlul hormonilor tiroidieni și reprezintă repere majore de dezvoltare deja utilizate în determinarea stadiului de dezvoltare. Dezvoltarea membrelor posterioare este utilizată calitativ în determinarea stadiul de dezvoltare, însă aici este luată în considerare ca parametru cantitativ. Prin urmare, lungimea membrelor posterioare este măsurată ca parametru studiat în vederea detectării efectelor asupra axului tiroidian (figura 2). Din motive de coerență, lungimea membrelor posterioare este măsurată la nivelul membrului posterior stâng. Lungimea membrelor posterioare este evaluată în ziua 7 și în ziua 21 a testului. În ziua 7, măsurarea lungimii membrelor posterior este simplă, astfel cum se ilustrează în figura 2. Cu toate acestea, măsurarea lungimii membrelor posterioare în ziua 21 este mai complicată ca urmare a flectării membrelor. Prin urmare, măsurarea lungimii membrelor posterioare în ziua 21 trebuie să înceapă de la peretele cavității abdominale și să urmeze linia mediană a membrului prin orice devieri unghiulare. Modificările lungimii membrelor posterioare în ziua 7, chiar dacă nu sunt evidente în ziua 21, sunt considerate în continuare semnificative pentru potențialul activității tiroidiene. Măsurătorile lungimilor sunt obținute fotografii digitale utilizând programe informatice de analiză, astfel cum este descris în documentul OCDE de orientare privind histologia tiroidei amfibienilor (9).

Lungimea corpului și greutatea umedă

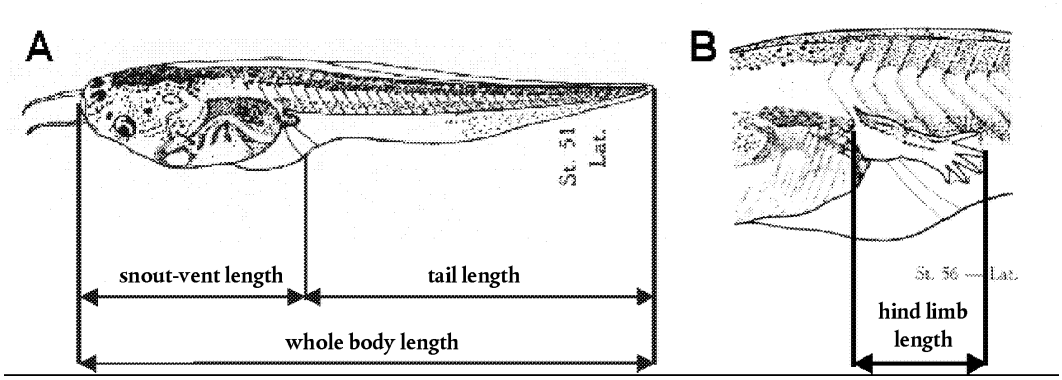
37. Determinarea lungimii bot-cloacă (SVL) (figura 2) și a greutății umede este inclusă în protocolul de testare în vederea evaluării efectelor posibile ale substanțelor chimice testate asupra ritmului de creștere a mormolocilor în raport cu grupal de control și sunt utile în detectarea toxicității generale determinate de substanța chimică testată. Întrucât eliminarea apei aderente pentru determinarea greutății poate provoca condiții de stres pentru mormoloci și poate cauza leziuni ale pielii, aceste măsurători sunt efectuate în ziua 7 pe mormolocii subeșantionați și pe toți mormolocii rămași la încheierea testului (ziua 21). Din motive de coerență, ca limită caudală de măsurare trebuie utilizat partea cranială a cloacei.

38. Lungimea bot-cloacă (SVL) este utilizată pentru a evalua creșterea mormolocilor astfel cum se ilustrează în figura 2.

▼M6

Figura 2

(A) Tipuri de măsurători ale lungimii corpului și (B) măsurători ale lungimii membrelor posterioare pentru mormoloci de *X. laevis* (1).



Histologia glandei tiroide

39. În timp ce stadiul de dezvoltare și lungimea membrelor posterioare reprezintă parametrii studiați importanți pentru evaluarea schimbărilor legate de expunere în dezvoltarea metamorfică, întârzierea în dezvoltare nu poate considerată, prin ea însăși, un indicator cu valoare diagnostică pentru activitatea antitiroidiană. Unele modificări pot fi observate doar prin analiza histopatologică de rutină. Criteriile de diagnostic includ hipertrofia/atrofia glandei tiroide, hipertrofia celulelor foliculare, hiperplazia celulelor foliculare și următoarele criterii calitative suplimentare: zona luminală foliculară, calitate coloidului și înălțimea/forma celulelor foliculare. Gradele de gravitate (4 grade) trebuie raportate. Informații privind obținerea și prelucrarea eșantioanelor pentru analize histologice și pentru efectuarea analizelor histologice pe eșantioane de țesuturi sunt disponibile în „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation*” (Testul metamorfozei la amfibieni: Partea 1 – Orientare tehnică pentru eșantionare morfologică și pregătire histologică) și în „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*” (Testul metamorfozei la amfibieni: Partea 2 – Metodă de interpretare a studiilor, criterii de diagnostic, aprecierea severității și atlas) (9). Laboratoarele care efectuează testul pentru prima dată (primele dăți) trebuie să solicite consiliere din partea unor patologi cu experiență în scopuri de formare înainte de efectuarea analizei histologice și a evaluării glandei tiroide. Schimbările evidente și semnificative în ceea ce privește parametrii apicali indicând accelerarea sau asincronia dezvoltării pot exclude necesitatea efectuării analizei histopatologice a glandelor tiroide. Cu toate acestea, absența unor modificări morfologice evidente sau a dovezilor privind întârzierea dezvoltării impun efectuarea analizelor histologice.

Mortalitate

40. Toate bazinele de testare trebuie verificate zilnic pentru a verifica dacă nu există mormoloci morți, iar numărul acestora se înregistrează pentru fiecare bazin. Data, concentrația și numărul bazinelor trebuie înregistrate pentru orice activitate de observare a mortalității. Animalele moarte trebuie îndepărtate din bazinul de testare imediat după ce au fost observate. O rată a mortalității de peste 10 % poate indica condiții de testare necorespunzătoare sau efecte toxice ale substanței chimice testate.

Observații suplimentare

41. Cazurile de comportament anormal și de malformații și leziuni vizibile macroscopic trebuie înregistrate. Data, concentrația și numărul bazinului trebuie înregistrate în caz că se observă comportament anormal, malformații sau leziuni vizibile macroscopic. Comportamentul normal

▼M6

este caracterizat prin rămânerea mormolocilor suspendați în coloana de apă cu coada ridicată deasupra capului, bătaia ritmică și regulată a înotătoarei caudale, ridicarea periodică la suprafață, opercularea și receptivitatea la stimuli. Un comportament anormal ar include, de exemplu, plutirea la suprafață, rămânerea pe fundul bazinului, înotare inversată sau neregulată, lipsa de activitate la suprafață și lipsa de reacție la stimuli. În plus, diferențele mari în consumul de hrană între tratamente trebuie înregistrate. Malformațiile și leziuni majore ar putea include anomalii morfologice (de exemplu, deformări ale membrelor), leziuni hemoragice, infecții bacteriene sau fungice, pentru a menționa doar câteva. Aceste determinări sunt calitative și trebuie considerate analoage semnelor clinice de boală/stres și trebuie raportate la animalele de control. În cazul în care apariția sau rata apariției este mai mare în bazinele expuse decât în cele de control, atunci acestea ar trebui considerate drept dovadă de toxicitate evidentă.

DATE ȘI RAPORTARE

Colectarea de date

42. Toate datele trebuie colectate cu ajutorul sistemelor electronice sau manuale care sunt în conformitate cu bunele practici de laborator (BPL). Datele studiului trebuie să includă:

Substanța chimică testată:

— Caracterizarea substanței chimice testate: proprietățile fizico-chimice; informații referitoare la stabilitate și biodegradabilitate;

— Informații și date privind substanța chimică: metoda și frecvența de pregătire a diluțiilor. Informațiile referitoare la substanța chimică testată includ concentrațiile reale și nominale ale substanței chimice testate, iar în unele cazuri, substanțe chimice neparentale, după caz. Măsurătorile privind substanța chimică testată pot fi necesare pentru soluțiile stoc, precum și pentru soluțiile de testare;

— Solvent (dacă este altul decât apa): justificarea alegerii unui solvent și caracterizarea solventului (natură, concentrație utilizată);

Condiții de testare:

— Înregistrări operaționale: acestea constau în observații referitoare la funcționarea sistemului de testare și la mediul și infrastructura de sprijin. Înregistrările tipice includ: temperatura ambiantă, temperatura de testare, perioada de expunere la lumină, starea componentelor critice ale sistemului de expunere (de exemplu pompe, contoare de cicluri, presiuni), debite, niveluri de apă, schimbări ale recipientelor de rezervă, precum și înregistrări privind hrănirea. Parametrii generali de calitate a apei includ: pH, OD, conductivitate, iod total, alcalinitate și duritate;

— Abateri de la metoda de testare: aceste informații trebuie să includă orice informație sau descrieri ale abaterilor de la metoda de testare;

Rezultate:

— Observații și date biologice: acestea includ observații zilnice legate de mortalitate, consumul de alimente, comportamentul de înot anormal, letargie, pierderea echilibrului, malformații, leziuni, etc. Observațiile și datele colectate la intervale prestabilite includ: stadiul de dezvoltare, lungimea membrelor posterioare, lungimea bot-cloacă și greutatea umedă;

▼M6

— Tehnicile de analiză statistică și justificarea tehnicilor utilizate; rezultatele analizei statistice, de preferat, sub formă de tabel;

— Date histologice: acestea includ descrieri, precum și severitatea gradată și scoruri privind incidența unor observații specifice, astfel cum se detaliază în documentul de orientare privind histopatologia;

— Observații *ad hoc*: aceste observații trebuie să includă descrieri ale studiului care nu se încadrează în categoriile descrise anterior.

Raportarea datelor

43. Apendicele 2 conține foi de calcul privind colectarea zilnică a datelor care pot fi utilizate ca orientări pentru introducerea datelor brute și pentru calcularea statisticilor sumare. În plus, tabelele de raportare sunt astfel elaborate încât să fie convenabile pentru comunicarea rezumatelor datelor privind parametrii studiați. Tabelele de raportare pentru evaluările histologice pot fi consultate în apendicele 2.

Criterii de performanță și de acceptabilitate/validitate a testelor

44. În general, abaterile majore de la metoda de testare vor conduce la date inacceptabile pentru interpretare sau raportare. Prin urmare, următoarele criterii din tabelul 4 au fost dezvoltate ca orientare pentru determinarea calității testului efectuat, performanța generală a organismelor de control.

Tabelul 4

Criterii de performanță pentru testul AMA.

Criteriu	Limite acceptabile
Concentrațiile testate	Menținute la ≤ 20 % CV (coeficient de variație) (variabilitatea concentrațiilor de testare măsurate) pe parcursul testului cu durata de 21 de zile
Mortalitatea în grupurilor de control;	≤ 10 % – mortalitatea în orice replică în grupurile de control trebuie să nu depășească 2 mormoloci
Stadiul de dezvoltare median minim al grupurilor de control la sfârșitul testului	57
Intervalul stadiilor de dezvoltare în grupul de control	A 10-a și a 90-a procentilă a distribuției stadiilor de dezvoltare nu trebuie să difere cu mai mult de 4 stadii.
Oxigen dizolvat	≥ 40 % față de saturația în aer (*)
pH	pH-ul trebuie menținut între 6,5 și 8,5. Diferențele între replici/tratament nu trebuie să depășească 0,5.
Temperatura apei	22° ± 1 °C – diferențele între replici/tratament nu trebuie să depășească 0,5 °C.
Concentrațiile de testare fără toxicitate evidentă	≥ 2
Performanța replicii	≤ 2 replici per test pot fi compromise

▼M6

Criteriu	Limite acceptabile
Condiții speciale de utilizare a unui solvent	Dacă se utilizează un solvent cărăuș, trebuie să se utilizeze un vas de control cu solvent și un vas de control cu apă curată, iar rezultatele trebuie raportate.
	Diferențele semnificative din punct de vedere statistic dintre vasul de control cu solvent și vasul de control cu apă curată sunt tratate în mod specific. Pentru informații suplimentare, a se vedea mai jos.
Condiții speciale pentru sistemul static cu reînnoire	Analizele substanțelor chimice reprezentative înainte și după reînnoire trebuie raportate.
	Nivelurile de amoniac trebuie măsurate imediat înainte de reînnoire.
	Toți parametrii legați de calitatea apei enumerați în tabelul 1 din apendicele 1 trebuie măsurați imediat înainte de reînnoire.
	Perioada de reînnoire nu trebuie să depășească 72 de ore.
	Program corespunzător de hrănire (50 % din porția zilnică de hrană din hrana comercială pentru mormoloci)

(*) Aerarea apei poate fi menținută prin barbotoare. Se recomandă setarea barbotoarelor la niveluri care să nu creeze mormolocilor un stres inutil.

Validitatea testului

45. Pentru ca un test să fie considerat acceptabil/valid, trebuie să fie îndeplinite următoarele cerințe:

Experiment valid în cadrul unui test determinat a fi negativ pentru activitatea tiroidei:

(1) Pentru orice tratament dat (inclusiv în grupurile de control), mortalitatea nu poate depăși 10 %. Pentru orice replică dată, mortalitatea nu poate depăși trei mormoloci, în caz contrar replica este considerată compromisă

(2) Cel puțin două niveluri de tratament, cu toate cele patru replici necompromise, trebuie să fie disponibile pentru analiză

(3) Cel puțin două niveluri de tratament fără toxicitate evidentă ar trebui să fie disponibile pentru analiză

Experiment valid în cadrul unui test determinat a fi pozitiv pentru activitatea tiroidei:

(1) Poate exista mortalitate de maximum doi mormoloci/replică în grupul de control

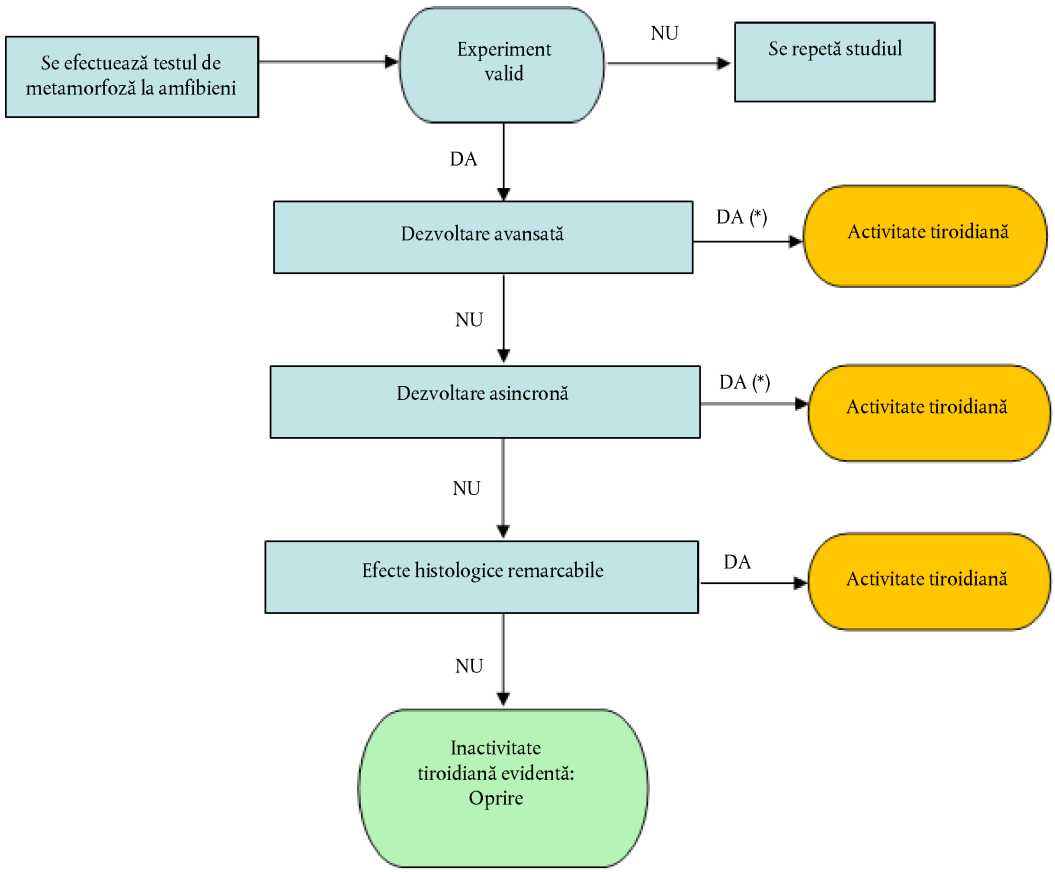
Arbore decizional pentru efectuarea testului AMA

46. Arborele decizional a fost dezvoltat astfel încât testul AMA să ofere asistență logică în efectuarea și interpretarea rezultatelor biotestului (a se vedea diagrama din figura 3). Arborele decizional, în esență, ponderează parametrii prin faptul că dezvoltarea avansată, dezvoltarea asincronă și histopatologia tiroidiană au o importanță mare, în timp ce dezvoltarea întârziată, lungimea bot-cloacă și greutatea corporală umedă, parametri care pot fi potențial afectați de toxicitatea generală, au o importanță mai mică.

▼M6

Figura 3

Arbore decizional pentru efectuarea testului AMA.



(*) Histologia poate fi solicitată de unele autorități de reglementare în pofida diferențelor semnificative în ceea ce privește dezvoltarea avansată și asincronă. Entitatea care efectuează acest test este încurajată să consulte autoritățile necesare înainte de efectuarea testului pentru a determina parametrii studiați necesari

Dezvoltarea avansată (determinată utilizând stadiul de dezvoltare, SVL și HLL)

47. Dezvoltarea avansată este cunoscută ca survenind numai prin efecte datorate hormonilor tiroidieni. Acestea pot fi efecte la nivelul țesuturilor periferice, precum interacțiunea directă cu receptorul hormonilor tiroidieni (cum ar fi T4) sau efecte care modifică nivelurile circulante ale hormonilor tiroidieni. În oricare dintre cazuri, acestea sunt considerate dovezi suficiente pentru a indica faptul că substanța chimică are activitate tiroidiană. Dezvoltarea avansată este evaluată în unul din două moduri. În primul mod, stadiul de dezvoltare generală poate fi evaluat pe baza metodei standardizate detaliate în Nieuwkoop și Faber (8). În al doilea mod, caracteristici morfologice specifice pot fi cuantificate, precum lungimea membrelor posterioare, în zilele 7 și 21, ele fiind asociate în mod pozitiv cu efecte agoniste asupra receptorilor hormonilor tiroidieni. În cazul în care apar progrese semnificative statistic în ceea ce privește dezvoltarea sau lungimea membrelor posterioare, testul indică faptul că substanța chimică este are activitate tiroidiană.

▼M6

48. Evaluarea animalelor testate privind prezența unei dezvoltări accelerate în raport cu populația de control se va baza pe rezultatele analizelor statistice efectuate pentru următorii patru parametri:

— lungimea membrelor posterioare (normalizată prin lungimea bot-cloacă) în ziua de studiu 7

— lungimea membrelor posterioare (normalizată prin lungimea bot-cloacă) în ziua de studiu 21

— stadiul de dezvoltare în ziua de studiu 7

— stadiul de dezvoltare în ziua de studiu 21.

49. Analizele statistice ale lungimii membrelor posterioare trebuie efectuate pe baza măsurătorilor lungimii membrului posterior stâng. Lungimea membrelor posterioare este normalizată prin stabilirea raportului dintre lungimea membrelor posterioare și lungimea bot-cloacă pentru un individ. Media valorilor normalizate pentru fiecare nivel de tratament sunt ulterior comparate. Accelerarea dezvoltării este apoi indicată printr-o creștere semnificativă a mediei lungimii membrelor posterioare (normalizate) într-un grup de tratament chimic în raport cu grupul de control în ziua de studiu 7 și/sau în ziua de studiu 21 (a se vedea apendicele 3).

50. Analizele statistice ale stadiului de dezvoltare trebuie efectuate pe baza determinării stadiilor de dezvoltare în conformitate cu criteriile morfologice descrise de Nieuwkoop și Faber (8). Accelerarea dezvoltării este indicată atunci când analiza multicuantică detectează o creștere semnificativă a valorilor stadiilor de dezvoltare într-un grup de tratament chimic în raport cu grupul de control în ziua de studiu 7 și/sau în ziua de studiu 21.

51. În ceea ce privește metoda de testare AMA, un efect semnificativ asupra oricăruia din cei patru parametri sus-menționați este considerat suficient pentru o detectare pozitivă a dezvoltării accelerate. Aceasta înseamnă că efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare într-un moment specific nu necesită coroborare nici cu efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare la momentul alternativ și nici cu efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare în acest moment specific. În schimb, efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare la un moment specific nu necesită coroborare nici cu efectele semnificative asupra stadiului de dezvoltare în momentul alternativ și nici cu efectele semnificative asupra lungimii membrelor posterioare în acest moment specific. Cu toate acestea, greutatea dovezilor privind dezvoltarea accelerată va crește dacă sunt detectate efecte semnificative la mai mult de un parametru.

Dezvoltarea asincronă (determinată utilizând criteriile de determinare a stadiului de dezvoltare)

52. Dezvoltarea asincronă este caracterizată prin perturbarea evoluției temporale a morfogenezei sau a dezvoltării diferitelor țesuturi într-un singur mormoloc. Incapacitatea de a stabili cu claritate stadiul de dezvoltare a unui organism utilizând setul de parametri morfologici considerați tipici pentru orice stadiu dat indică faptul că țesuturile se dezvoltă asincron prin metamorfoză. Dezvoltarea asincronă este un indicator al activității tiroidiene. Singurele modalități de acțiune cunoscute care conduc la dezvoltare asincronă sunt prin efecte ale substanțelor chimice asupra acțiunilor hormonilor tiroidieni la nivel periferic și/sau asupra metabolismului hormonilor tiroidieni în țesuturile în curs de dezvoltare astfel cum se observă în cazul inhibitorilor deiodinazei.

▼**M6**

53. Evaluarea animalelor testate privind prezența dezvoltării asincrone în raport cu populația de control se va baza pe evaluarea morfologică macroscopică a animalelor testate în ziua de studiu 7 și în ziua de studiu 21.

54. Descrierea dezvoltării normale a *Xenopus laevis* de către Nieuwkoop și Faber (8) furnizează cadrul necesar identificării unei ordini secvențiale de remodelare a țesuturilor normale. Termenul „dezvoltare asincronă” se referă în mod specific la abaterile de la dezvoltarea morfologică macroscopică a mormolocilor care nu permit stabilirea definitivă a unui stadiu de dezvoltare în conformitate cu criteriile stabilite de Nieuwkoop și Faber (8), deoarece reperele morfologice esențiale prezintă caracteristici ale unor stadii diferite.

55. Astfel cum implică termenul „dezvoltare asincronă”, trebuie luate în considerare numai cazurile care prezintă abateri de la progresul remodelării țesuturilor specifice în raport cu progresul remodelării altor țesuturi. Unele fenotipuri clasice includ întârzierea sau absența apariției membrelor anterioare în pofida dezvoltării normale sau avansate a membrelor posterioare și a țesuturilor cozii, sau resorbția precoce a branhiilor în raport cu stadiul morfogenezei membrelor posterioare și resorbția cozii. Un animal va fi înregistrat ca prezentând o dezvoltare asincronă dacă acesta nu poate fi atribuit unui stadiu deoarece nu îndeplinește majoritatea criteriilor-reper de dezvoltare pentru un anumit stadiu conform Niewkoop și Faber (8) sau dacă există întârziere sau accelerare extremă a uneia sau a mai multor caracteristici esențiale (de exemplu, coadă complet resorbită, dar fără apariția membrelor anterioare). Această evaluare se efectuează calitativ și trebuie să examineze setul complet de caracteristici-reper enumerate de Nieuwkoop și Faber (8). Cu toate acestea, nu este necesară înregistrarea stadiului de dezvoltare a diferitelor caracteristici-reper ale animalelor observate. Animalelor înregistrate ca prezentând o dezvoltare asincronă nu li se atribuie un stadiu de dezvoltare Nieuwkoop și Faber (8).

56. Prin urmare, un criteriu central pentru desemnarea cazurilor de dezvoltare morfologică anormală ca „dezvoltare asincronă” este acela că momentul relativ al remodelării tisulare și al morfogenezei țesuturilor este perturbat în timp ce morfologia țesuturilor afectate nu este evident anormală. Un exemplu pentru ilustrarea acestei interpretări a anomaliilor morfologice macroscopice este faptul că o întârziere a morfogenezei membrelor posterioare în raport cu dezvoltarea altor țesuturi va îndeplini criteriul de „dezvoltare asincronă” în timp ce cazurile care prezintă lipsa membrelor posterioare, degete anormale (de exemplu ectrodactilie, polidactilie), sau alte malformații evidente ale membrelor nu trebuie considerate drept „dezvoltare asincronă”.

57. În acest context, principalele repere morfologice care trebuie evaluate din punctual de vedere al progresului lor metamorfic coordonat trebuie să includă morfogeneza membrelor posterioare, morfogeneza membrelor anterioare, apariția membrelor anterioare, stadiul de resorbție a cozii (în special resorbția înotătoarei caudale) și morfologia capului (de exemplu, dimensiunea branhiilor și stadiul resorbției branhiilor, morfologia maxilarului inferior, proeminența cartilajului Meckel).

58. În funcție de modul de acțiune al substanței chimice, pot apărea diferite fenotipuri morfologice macroscopice. Unele fenotipuri clasice includ întârzieri sau absențe ale apariției membrelor anterioare în pofida dezvoltării normale sau avansate a membrelor posterioare și a țesuturi cozii, resorbția precoce a branhiilor în raport cu membrele posterioare și remodelarea cozii.

▼**M6**

Histopatologie

59. În cazul în care substanța chimică nu cauzează toxicitate evidentă și nu accelerează dezvoltarea sau nu conduce la dezvoltare asincronă, atunci histopatologia glandelor tiroide este evaluată pe baza documentului de orientare adecvat (9). Întârzierea dezvoltării, în absența toxicității, reprezintă un indicator puternic al activității antitiroidiene, însă analiza stadiului de dezvoltare este mai puțin sensibilă și cu valoare diagnostică mai mică decât analiza histopatologică a glandei tiroide. Prin urmare, efectuarea de analize histopatologice ale glandelor tiroide este necesară în acest caz. Efectele asupra histologiei glandei tiroide au fost demonstrate în absența unor efecte asupra dezvoltării. În cazul în care apar modificări în histopatologia tiroidiană, substanța chimică este considerată a avea activitate tiroidiană. În cazul în care nu sunt observate întârzieri în dezvoltare sau leziuni histologice în glandele tiroide, substanța chimică este considerată a nu avea activitate tiroidiană. Raționamentul acestei decizii este faptul că glanda tiroidă este sub influența TSH și orice substanță chimică care modifică hormonii tiroidieni circulanți suficient pentru a modifica secreția de TSH va conduce la modificări histopatologice ale glandelor tiroide. Diverse moduri și mecanisme de acțiune pot modifica hormonii tiroidieni circulanți. Așadar, în timp ce nivelul hormonilor tiroidieni indică un efect tiroidian, el este insuficient pentru a determina modul sau mecanismul de acțiune care determină răspunsul.

60. Deoarece acest parametru nu poate fi analizat prin metode statistice de bază, determinarea unui efect asociat cu expunerea la o substanță chimică trebuie efectuată pe baza opiniei experte a unui patolog.

Dezvoltarea întârziată (determinată utilizând stadiul de dezvoltare, HLL, BW, SVL)

61. Dezvoltarea întârziată poate avea loc prin intermediul unor mecanisme antitiroidiene și prin toxicitate indirectă. Ușoarele întârzieri de dezvoltare cuplate cu semne evidente de toxicitate indică un posibil efect toxic nespecific. Evaluarea toxicității netiroidiene reprezintă un element esențial al testului pentru a reduce probabilitatea unor rezultate fals pozitive. Mortalitatea excesivă reprezintă un indiciu evident că operează alte mecanisme toxice. În mod similar, ușoare reduceri în creștere, astfel cum sunt stabilite prin greutatea umedă și/sau SVL sugerează, de asemenea, toxicitate netiroidiană. Creșteri aparente ale creșterii sunt de obicei observate în cazul substanțelor chimice care afectează negativ dezvoltarea normală. În consecință, prezența unor animale mai mari nu indică neapărat o toxicitate netiroidiană. Totuși, toxicitatea tiroidiană nu trebuie stabilită niciodată doar pe baza creșterii. Mai degrabă, creșterea, în coroborare cu stadiul de dezvoltare și cu histopatologia tiroidiană, trebuie utilizată pentru a determina activitatea tiroidei. De asemenea, pentru determinarea toxicității evidente, trebuie să fie luați în considerare alți parametri incluzând edemul, leziunile hemoragice, letargia, consumul de produse alimentare redus, comportamentul anormal/modificare a înotului, etc. Dacă toate concentrațiile de testare determină semne de toxicitate evidentă, substanța chimică testată trebuie reevaluată la concentrații de testare mai mici înainte de a determina dacă substanța chimică este potențial activă la nivel tiroidian sau nu are activitate tiroidiană.

62. Întârzierile de dezvoltare semnificative din punct de vedere statistic, în absența altor semne de toxicitate evidentă, indică faptul că substanța chimică are activitate tiroidiană (antagonistă). În absența unor răspunsuri statistice solide, acest rezultat poate fi sporit cu rezultate obținute în urma histopatologiei tiroidiene.

▼M6

Analize statistice

63. Analizele statistice ale datelor ar trebui să urmeze, de preferat, proceduri descrise în documentul „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*” (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind exotoxicitatea: orientări de aplicare) (11). Pentru toți parametri studiați cantitativi continui (HLL SVL, greutate umedă) care prezintă o relația doză-răspuns monotonă trebuie aplicat testul Jonckheere-Terpstra în manieră descrescătoare pentru a stabili existența unui efect semnificativ al tratamentului.

64. Pentru parametrii continui care nu sunt compatibili cu o relație doză-răspuns monotonă, datele trebuie să fie evaluate din punctul de vedere al normalității (de preferat cu ajutorul testului Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling) și al omogenității variației (de preferat cu ajutorul testului Levene). Ambele teste sunt efectuate pe reziduurile de la o ANOVA. Se poate recurge la opinia experților în locul acestor teste formale privind normalitatea și omogenitatea variației, deși sunt preferate testele formale. În cazul în care se constată o anormalitate sau o eterogenitate a variației, trebuie căutată o normalizare, o transformare de stabilizare a variației. În cazul în care datele (probabil după o transformare) sunt distribuite în mod normal cu o varianță omogenă, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Dunnett. În cazul în care datele (probabil după o transformare) sunt distribuite în mod normal cu o varianță eterogenă, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Tamhane-Dunnett sau prin testul T3 sau prin testul Mann-Whitney-Wilcoxon U. În cazul în care nu se poate constata vreo transformare de normalizare, un efect semnificativ al tratamentului este determinat prin testul Mann-Whitney-Wilcoxon U utilizând o ajustare Bonferroni-Holm la valorile p. Testul Dunnett se aplică independent de orice test ANOVA F, iar testul Mann-Whitney se aplică independent de orice test de ansamblu Kruskall-Wallis.

65. Nu se preconizează o mortalitate semnificativă, însă aceasta trebuie evaluată prin testul Cochran-Armitage regresiv dacă datele sunt compatibile o relație doză-răspuns monotonă, iar altfel, prin testul Exact al lui Fisher cu o ajustare Bonferroni-Holm.

66. Un efect semnificativ al tratamentului asupra stadiului de dezvoltare este determinat prin aplicarea regresivă a testului Jonckheere-Terpstra aplicat medianelor replicilor. În mod alternativ, și de preferat, testul Jonckheere multicuantic de la a 20-a la a 80-a procentilă trebuie să fie utilizat pentru determinarea efectului, deoarece ia în considerare modificările profilului distribuției.

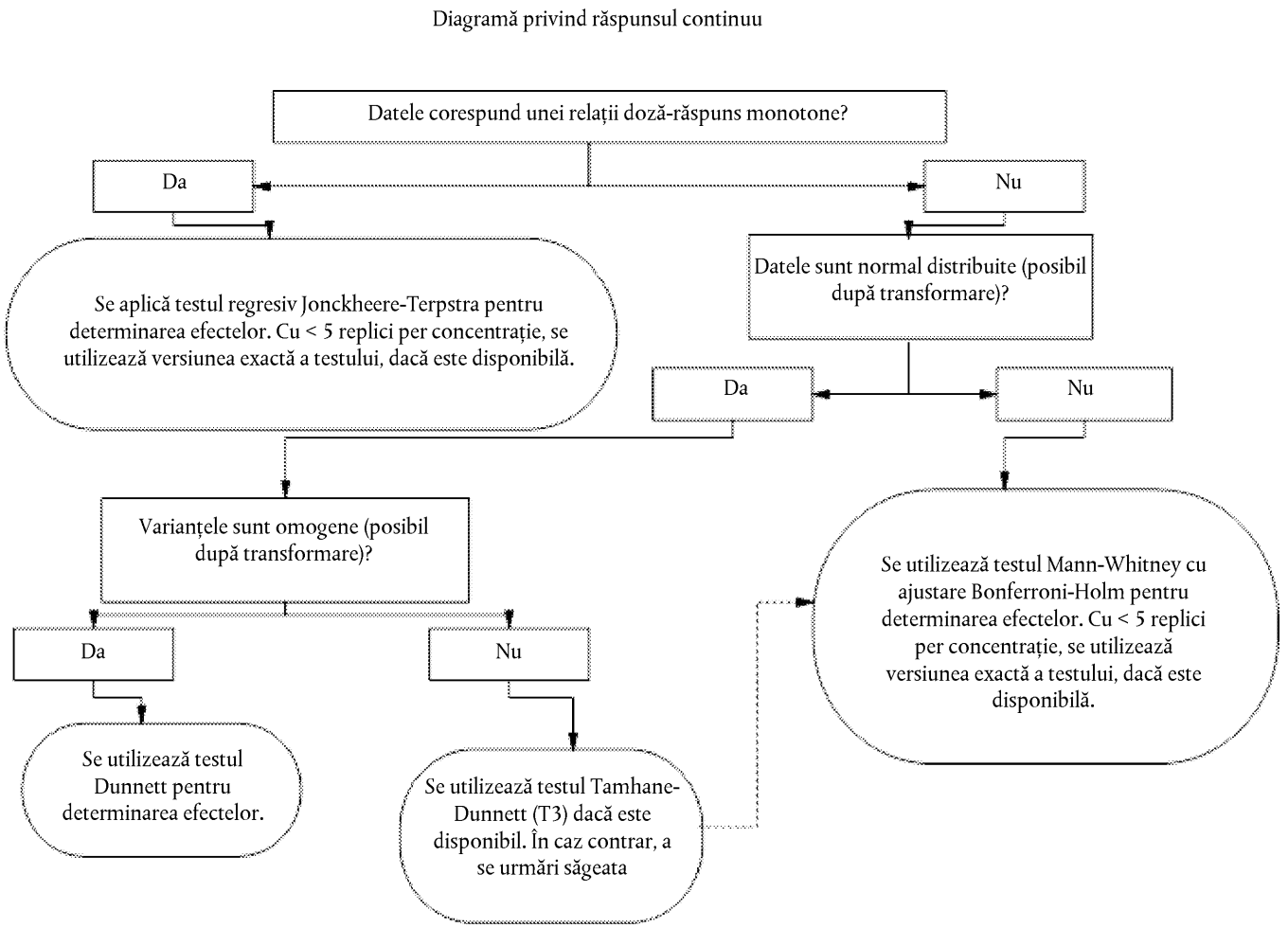
67. Unitatea de analiză corespunzătoare este replica, astfel încât datele constau în mediane ale replicilor dacă este utilizat testul Jonckheere-Terpstra sau testul Mann-Whitney U, sau mediile replicilor dacă este utilizat testul Dunnett. Relația monotonă doză-răspuns poate fi evaluată vizual cu ajutorul mediilor sau al medianelor replicilor și tratamentului sau cu ajutorul testelor formale, precum cele descrise anterior (11). În condițiile în care se utilizează sub cinci replici per tratament sau control, versiunile de permutare exacte ale testelor Jonckheere-Terpstra și Mann-Whitney trebuie utilizate dacă sunt disponibile. Semnificația statistică a tuturor testelor indicate este considerată la nivelul de 0,05.

68. Figura 4 reprezintă o organigramă pentru efectuarea de teste statistice asupra datelor continue.

▼M6

Figura 4

Diagramă a metodelor statistice pentru datele privind răspunsuri continue.



▼M6

Considerații speciale privind analiza datelor

Utilizarea nivelurilor de tratament compromise

69. O serie de factori trebuie luați în considerare pentru a determina dacă o replică sau întregul tratament demonstrează toxicitate evidentă și trebuie excluși din analiză. Toxicitatea evidentă se caracterizează printr-o mortalitate > 2 indivizi în orice replică care nu poate fi explicată decât prin toxicitate și nu printr-o eroare tehnică. Alte semne ale toxicității evidente includ hemoragia, comportamentele anormale, modalitățile anormale de înot, anorexia și orice alt semn clinic de boală. În ceea ce privește semnele subletale de toxicitate, pot fi necesare evaluări calitative care trebuie întotdeauna realizate în raport cu un grup de control dintr-un vas cu apă curată.

Vase de control cu solvent

70. Utilizarea unui solvent trebuie avută în vedere ca ultimă soluție, după epuizarea tuturor celorlalte opțiuni de livrare a substanței chimice. În cazul utilizării unui solvent, este imperativă utilizarea unui grup de control într-un vas cu apă curată. La încheierea testului, trebuie efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului. Aceasta se realizează printr-o comparație statistică a grupului de control din vasul cu solvent și a grupului de control din vasul cu apă curată. Cei mai relevanți parametri pentru această analiză sunt stadiul de dezvoltare, SVL și greutatea umedă, deoarece acestea pot fi afectate prin toxicități netiroidiene. În cazul în care sunt constatate diferențe semnificative din punct de vedere statistic ale acestor parametri între grupul de control din vasul cu apă curată și grupul de control din vasul cu solvent, trebuie determinați parametrii studiului pentru măsurătorile răspunsului folosind grupul de control din vasul cu apă curată. Dacă nu se constată diferențe semnificative din punct de vedere statistic între grupul de control din vasul cu apă curată și grupul de control din vasul cu solvent pentru toate variabilele măsurătorilor răspunsului, trebuie determinați parametrii studiului pentru măsurătorile răspunsului utilizând un grupurile de control comasate din vasul cu apă de diluție și din cel cu solvent.

Grupurile de tratament care ating un stadiu de dezvoltare superior sau egal cu 60

71. După stadiul 60, mormolocii scad ca dimensiune și greutate ca urmare a resorbției țesuturilor și a reducerii conținutului de apă în valoare absolută. Astfel, măsurarea greutății umede și a lungimii bot-cloacă nu poate fi utilizată în analizele statistice ale diferențelor vitezelor de creștere. Prin urmare, datele referitoare la greutatea umedă și la lungime ale organismelor aflate într-un stadiu NF mai mare de 60 trebuie cenzurate și eliminate din analizele mediilor sau medianelor replicilor. Două metode diferite ar putea fi utilizate pentru a analiza acești parametri de creștere.

72. Una dintre metode constă în luarea în considerare exclusiv a mormolocilor cu stadii de dezvoltare mai mici sau egale cu 60 pentru analizele statistice ale greutății umede și/sau ale lungimii bot-cloacă. Această metodă este considerată a furniza informații suficient de solide cu privire la severitatea posibilelor efecte asupra creșterii, cu condiția ca proporția animalelor de testare excluse din analize să fie mică (≤ 20 %). Dacă un număr crescut de mormoloci se caracterizează printr-un stadiu de dezvoltare mai mare decât 60 (≥ 20 %) pentru una sau mai multe concentrații nominale, atunci trebuie realizată o structură ANOVA bifactorială cu o variantă ierarhică pentru toți mormolocii pentru a evalua efectele asupra creșterii ale tratamentelor chimice, luând în considerare în același timp efectul stadiului târziu de dezvoltare asupra creșterii. Apendicele 3 furnizează orientări privind analiza ANOVA bifactorială pentru greutate și lungime..

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelpia, PA

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439-98

(7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. & Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551

(8) Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris

(10) Dodd, M.H.I. & Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

▼M6

Apendicele 1

Tabelul 1

Condiții experimentale pentru testul de metamorfoză la amfibieni de 21 de zile

Animale utilizate în test		Larve de *Xenopus laevis*	
Stadiul larvar inițial		Stadiul 51 conform Nieuwkoop și Faber	
Perioada de expunere		21 de zile	
Criteriile de selecție a larvelor		Stadiul de dezvoltare și lungimea totală (opțional)	
Concentrațiile de testare		Minimum 3 concentrații care acoperă aproximativ un ordin de magnitudine	
Regimul de expunere		Cu flux continuu (preferat) și/sau static cu reînnoire	
Debitul sistemului de testare		25 ml/min (înlocuirea completă a volumului la aproximativ fiecare 2,7 h)	
Parametri studiați principali /zile de determinare		Mortalitate	Zilnic
		Stadiu de dezvoltare	Z 7 și 21
		Lungimea membrelor posterioare	Z 7 și 21
		Lungimea bot-cloacă	Z 7 și 21
		Greutatea corporală umedă	Z 7 și 21
		Histologia glandei tiroide	Z 21
Apa de diluție/control de laborator		Apă de robinet declorurată (cu filtru de carbon) sau sursă echivalentă de laborator	
Densitatea larvelor		20 larve/vas de testare (5/l)	
Soluție de testare/vas de testare		4– 10 l (10– 15 cm de apă minimum)/vas de testare din sticlă sau din oțel inoxidabil (de exemplu, 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replică		4 vase-replică de testare/concentrație de testare și control	
Rată de mortalitate admisă în grupurile de control		≤ 10 % per vas-replică de testare	
Fixare tiroidiană	Număr fixat	Toți mormolocii (5/replică sunt evaluați inițial)	
	Regiune	Cap sau întregul corp	
	Lichide de fixare	Fixatorul Davidson	
Hrănire	Hrană	Sera Micron® sau echivalent	
	Cantitate/frecvență	A se vedea tabelul 1 pentru regimul de hrănire cu Sera Micron®	
Iluminat	Perioadă de expunere la lumină	12 h lumină: 12 h întuneric	

▼**M6**

	Intensitate	600 – 2 000 lux (măsurată la suprafața apei)
Temperatura apei		22° ± 1 °C
pH		6,5 – 8,5
Concentrația oxigenului dizolvat (OD)		> 3,5 mg/l (> 40 % saturația în aer)
Program de eșantionare pentru analize chimice		O dată/săptămână (4 eșantionări/test)

▼M6

Apendicele 2

Tabele pentru raportarea datelor brute și de sinteză

Tabelul 1

Informații generale privind substanțele chimice testate

Informații privind substanțele chimice			
	A se introduce substanța chimică testată, unitățile concentrațiilor și tratamentele		
	Substanța chimică testată:		
	Unități ale concentrațiilor:		
	Tratament 1		
	Tratament 2		
	Tratament 3		
	Tratament 4		
	Data (ziua 0):		A se introduce data (ll/zz/aa)
	Data (ziua 7):		A se introduce data (ll/zz/aa)
	Data (ziua 21):		A se introduce data (ll/zz/aa)

Tabelul 2

Fișe de colectare a datelor primare pentru zilele 7 și 21

ZIUA X
DATA 00/00/00

	Concentrație	Număr tratament	Număr replică	Număr individual	Identificator individual	Stadiu de dezvoltare	Lungimea SVL (mm)	Lungimea membrelor posterioare (mm)	Greutatea umedă a întregului organism (mg)
RÂND	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIU	BL	HLL	GREUTATE
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Concentrație	Număr tratament	Număr replică	Număr individual	Identificator individual	Stadiu de dezvoltare	Lungimea SVL (mm)	Lungimea membrelor posterioare (mm)	Greutatea umedă a întregului organism (mg)
RÂND	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIU	BL	HLL	GREUTATE
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Concentrație	Număr tratament	Număr replică	Număr individual	Identificator individual	Stadiu de dezvoltare	Lungimea SVL (mm)	Lungimea membrelor posterioare (mm)	Greutatea umedă a întregului organism (mg)
RÂND	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIU	BL	HLL	GREUTATE
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Concentrație	Număr tratament	Număr replică	Număr individual	Identificator individual	Stadiu de dezvoltare	Lungimea SVL (mm)	Lungimea membrelor posterioare (mm)	Greutatea umedă a întregului organism (mg)
RÂND	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIU	BL	HLL	GREUTATE
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Tabelul 3

Sinteze calculate pentru datele parametrilor din zilele 7 și 21

		Stadiu de dezvoltare			SVL (mm)		Lungimea membrelor posterioare (mm)		Greutate (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDIANĂ	MAX	MEDIE	STADIU DE DEZVOL-TARE	MEDIE	STADIU DE DEZVOLT-ARE	MEDIE	STADIU DE DEZVOLT-ARE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Notă: Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 2.

Tabelul 4

Date privind mortalitatea zilnică

Ziua de testare	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Valoare!																
2	#Valoare!																
3	#Valoare!																
4	#Valoare!																
5	#Valoare!																

▼**M6**

Ziua de testare	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Valoare!																
7	#Valoare!																
8	#Valoare!																
9	#Valoare!																
10	#Valoare!																
11	#Valoare!																
12	#Valoare!																
13	#Valoare!																
14	#Valoare!																
15	#Valoare!																
16	#Valoare!																
17	#Valoare!																
18	#Valoare!																
19	#Valoare!																
20	#Valoare!																
21	#Valoare!																
Număr per replică		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Număr per tratament		0				0				0				0			

Notă: Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 1.

Tabelul 5

Criterii privind calitatea apei

Sistemul de expunere (cu flux continuu/static cu reînnoire):
Temperatura:
Intensitatea luminii:
Ciclul lumină-întuneric:
Hrană:
Frecvența hrănirii:
pH-ul apei:
Concentrația de iod în apa utilizată pentru testare

▼**M6**

Tabelul 6

Data de sinteză privind substanțele chimice:

Denumirea substanței chimice:																					
Cas #:																					
Ziua de testare	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Valoare!																				
2	#Valoare!																				
3	#Valoare!																				
4	#Valoare!																				
5	#Valoare!																				
6	#Valoare!																				
7	#Valoare!																				
8	#Valoare!																				
9	#Valoare!																				
10	#Valoare!																				
11	#Valoare!																				
12	#Valoare!																				
13	#Valoare!																				
14	#Valoare!																				
15	#Valoare!																				
16	#Valoare!																				
17	#Valoare!																				
18	#Valoare!																				
19	#Valoare!																				
20	#Valoare!																				
21	#Valoare!																				

Notă: Calculele din celule sunt asociate cu datele introduse în tabelul 1.

▼**M6**

Tabelul 7:

Tabele de raportare a histopatolog iei pentru criteriile de bază

Data: Substanța chimică: Patolog:

		Hipertrofia glandei tiroide	Atrofia glandei tiroide	Hipertrofia celulelor foliculare	Hiperplazia celulelor foliculare
Control Animal ID – replică 1					
Control Animal ID – replică 2					
Total:					

		Hipertrofia glandei tiroide	Atrofia glandei tiroide	Hipertrofia celulelor foliculare	Hiperplazia celulelor foliculare
Doză Animal ID – replică 1					
Doză Animal ID – replică 2					
Total:					

		Hipertrofia glandei tiroide	Atrofia glandei tiroide	Hipertrofia celulelor foliculare	Hiperplazia celulelor foliculare
Doză Animal ID – replică 1					
Doză Animal ID – replică 2					
Total:					

		Hipertrofia glandei tiroide	Atrofia glandei tiroide	Hipertrofia celulelor foliculare	Hiperplazia celulelor foliculare
Doză Animal ID – replică 1					
Doză Animal ID – replică 2					
Total:					

▼**M6**

Tabelul 8:

Criterii histopatologie suplimentare

Data: Substanța chimică: Patolog:

		Creșterea ariei lumenului folicular	Scăderea ariei lumenului folicular
Control Animal ID – replică 1			
Control Animal ID – replică 2			
Total:			

		Creșterea ariei lumenului folicular	Scăderea ariei lumenului folicular
Doză Animal ID – replică 1			
Doză Animal ID – replică 2			
Total:			

		Creșterea ariei lumenului folicular	Scăderea ariei lumenului folicular
Doză Animal ID – replică 1			
Doză Animal ID – replică 2			
Total:			

		Creșterea ariei lumenului folicular	Scăderea ariei lumenului folicular
Doză Animal ID – replică 1			
Doză Animal ID – replică 2			
Total:			

▼**M6**

Tabelul 9

Descrieri ale concluziilor histopatologice

Data:

Substanța chimică:

Patolog:

		Descriere
Control Animal ID – replică 1		
Control Animal ID – replică 2		
Doză Animal ID – replică 1		
Doză Animal ID – replică 2		

▼**M6**

Doză Animal ID – replică 1		
Doză Animal ID – replică 2		
Doză Animal ID – replică 1		
Doză Animal ID – replică 2		

▼M6

Tabelul 10

Tabel sintetic de raportare pentru ziua x (7 sau 21) a AMA

		Control				Doza 1					Doza 2					Doza 3				
Parametru studiat	Replică	Medie	SD	CV	N	Medie	SD	CV	N	valoare p	Medie	SD	CV	N	valoare p	Medie	SD	CV	N	valoare p
Lungimea membrelor posterioare (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medie:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medie:																			
Greutate umedă (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medie:																			

▼M6

Tabelul 11

Model de tabel sintetic de raportare pentru ziua x (7 sau 21) a datelor privind stadiile de dezvoltare pentru testul AMA

		Control				Doza 1					Doza 2					Doza 3				
	Replică	Mediană	Minim	Maxim	N	Mediană	Minim	Maxim	N	valoare p	Mediană	Minim	Maxim	N	valoare p	Mediană	Minim	Maxim	Mediană	valoare p
Stadiu de dezvoltare	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medie:																			

▼**M6**

Apendicele 3

Analiză alternativă a greutății și a lungimii în caz de stadiu târziu de dezvoltare care afectează peste 20 % dintre mormoloci pentru una sau mai multe concentrații

Dacă un număr crescut de mormoloci se caracterizează printr-un stadiu de dezvoltare mai mare decât 60 (≥ 20 %) pentru una sau mai multe concentrații nominale, atunci trebuie realizată o structură ANOVA bifactorială cu o variantă ierarhică pentru toți mormolocii pentru a evalua efectele asupra creșterii ale tratamentelor chimice, luând în considerare în același timp efectul stadiului târziu de dezvoltare asupra creșterii.

Propunerea este de a utiliza toate datele, dar ținând cont de efectul stadiului târziu de dezvoltare. Aceasta se poate realiza cu o ANOVA bifactorială cu o variantă ierarhică. Se definește *LateStage* =„Da” pentru un animal dacă stadiul său de dezvoltare este 61 sau mai mare. Altfel, se definește *LateStage* = „Nu”. Ulterior, poate fi realizată o ANOVA bifactorială concentrație și *LateStage* și interacțiunea acestora, cu *Rep(Conc)* un factor aleatoriu și *Tadpole(Rep)* alt efect aleatoriu. Aceasta tratează încă *rep* ca unitate de analiză și furnizează, în esență, aceleași rezultate ca o analiză ponderată a mediilor *rep*latestage*, ponderată cu numărul de animale per medie. Dacă datele încalcă normalitatea sau varianța cerințelor de omogenitate ale ANOVA, atunci poate fi realizată o transformare ierarhizată normalizată pentru îndepărta obiecția.

În plus față de testele standard ANOVA F pentru efectele Conc, LateStage și interacțiunile lor, testul F pentru interacțiuni poate fi „divizat” în două teste ANOVA F, unul vizând răspunsurile medii pentru concentrații pentru LateStage = „Nu” și altul vizând răspunsurile medii pentru concentrații pentru LateStage = „Da”. Comparații suplimentare ale mediilor tratamentelor în raport cu controlul se efectuează în cadrul fiecărui nivel de *LateStage*. O analiză a tipului de tendințe poate fi efectuată utilizând contraste corespunzătoare sau prin comparații simple pe perechi dacă există dovezi ale unei relații doză-răspuns nemonotone în cadrul unui nivel al variabilei *LateStage*. O ajustare Bonferroni-Holm a valorilor p se efectuează numai dacă diviziunea F corespunzătoare nu este semnificativă. Aceasta se poate realiza în SAS și, probabil, cu ajutorul altor pachete de software statistic. Pot apărea complicații atunci când nu există animale în stadiu târziu pentru anumite concentrații, însă aceste situații pot fi gestionare în mod direct.

▼**M6**

Apendicele 4

Definiții

Substanța chimică: o substanță sau un amestec

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec testate prin această metodă de testare.

▼M6

C.39. TEST DE REPRODUCERE A COLEMBOLELOR ÎN SOL

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 232 (2009). Această metodă de testare este concepută pentru a evalua efectele substanțelor chimice asupra producției reproductive a colembolelor în sol. Ea se bazează pe procedurile existente (1) (2). Specia *Folsomia candida,* care se reproduce partenogenetic, și specia *Folsomia fimetaria,* care se reproduce sexual, sunt două dintre cele mai accesibile specii de colembole care pot fi cultivate și care sunt disponibile comercial. Atunci când habitate specifice care nu sunt acoperite de aceste două specii trebuie să fie evaluate, procedura poate fi extinsă și la alte specii de colembole, dacă acestea pot îndeplini criteriile de validitate a testului.

2. Colembolele care trăiesc în sol sunt specii relevante din punct de vedere ecologic pentru testarea ecotoxicității. Colembolele sunt hexapode cu un exoschelet subțire foarte permeabil la aer și la apă și reprezintă specii de artropode cu diferite rute și cu diferite rate de expunere în raport cu râmele și cu enchitreidele.

3. Densitățile populațiilor de colembole ating frecvent 10^5 m^{-2} în sol și în straturile de frunze în multe ecosisteme terestre (3) (4). Adulții măsoară în mod obișnuit între 0,5 și 5 mm, iar contribuția acestora la biomasa totală a animalelor din sol este mică, fiind estimată a fi cuprinsă între 1 % și 5 % (5). Prin urmare, rolul lor cel mai important poate fi acela de organism cu potențial de reglare a proceselor prin acționând ca prădător de microorganisme și microfaună. Colembolele sunt animale de pradă pentru o mare varietate de nevertebrate endogeice și epigeice precum acarieni, miriapode, păianjeni, carabide și stafilinide. Colembolele contribuie la procesele de descompunere în solurile acide unde e posibil ca ele să fie cele mai importante nevertebrate din sol pe lângă enchitreide, întrucât râmele și diplopodele sunt în general absente.

4. *F. fimetaria* este răspândită în toată lumea și este frecvent întâlnită în mai multe tipuri de sol, de la solul nisipos la solul argilos și de la soluri cu humus neacid (*mull*) la soluri cu humus acid (*mor*). Este o specie de colembolă anoftalmică și nepigmentată. A fost observată în solurile agricole din întreaga Europă (6). Are un obicei de hrănire omnivor, incluzând hife fungice, bacterii, protozoare și resturi. Interacționează în pășuni cu ciuperci patogene pentru plante (7) și pot influența micoriza, după cum se știe că este cazul pentru F. candida. La fel ca cea mai mare parte dintre speciile de colembole, ea se reproduce sexual, fiind necesară prezența permanentă a masculilor pentru fertilizarea ouălor.

5. *F. candida* este, de asemenea, răspândită în toată lumea. Deși aceasta nu este frecvent întâlnită în cea mai mare parte a solurilor naturale, ea se întâlnește deseori în număr foarte mare în solurile bogate în humus. Este o specie de colembolă anoftalmică și nepigmentată. Este prevăzută cu o furcă (aparat de sărit) bine dezvoltată, se deplasează repede și sare cu ușurință dacă este perturbată. Rolul ecologic al *F. candida* este similar celui al *F. fimetaria*, însă habitatele sunt constituite din soluri mai bogate în materii organice. Se reproduce prin partenogeneză. Proporția masculilor poate fi mai mică decât 1 la o mie.

PRINCIPIUL TESTULUI

6. Colembolele sincrone, adulte (*F. fimetaria*) sau tinere (*F. candida*) sunt expuse unui interval de concentrații ale substanțelor chimice testate amestecate într-un sol modificat artificial (8) utilizând conținut organic în proporție de 5 % (sau un sol alternativ). Scenariul de testare poate fi împărțit în două etape:

   — Un test de stabilire a intervalului, în cazul în care nu există suficiente informații disponibile privind toxicitatea, în care mortalitatea și

▼M6

reproducerea reprezintă principalii parametri studiați, fiind evaluați după 2 săptămâni pentru *F. fimetaria* și după 3 săptămâni pentru *F. candida*.

— Un test de reproducere definitiv în care sunt evaluate numărul total al colembolelor tinere produse de animalele-părinți și rata de supraviețuire a animalelor-părinți. Durata testului definitiv este de 3 săptămâni pentru *F. fimetaria* sau de 4 săptămâni pentru *F. candida*.

Efectul toxic al substanței chimice testate asupra mortalității și a producției reproductive este exprimat în LC_x și EC_x, datele fiind ajustate conform unui model adecvat prin intermediul unei regresii neliniare pentru a estima concentrația care ar cauza o mortalitate de x % sau, respectiv, scăderea producției reproductive, sau, alternativ, ca valoare NOEC/LOEC (9).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

7. Ar fi de preferat să se cunoască proprietățile fizice, solubilitatea în apă, log K_{ow}, coeficientul de partiție sol-apă și presiunea vaporilor substanței chimice testate. Este de dorit să fie disponibile informații suplimentare privind soarta substanței chimice testate în sol, precum viteza de fotoliză, de hidroliză și de degradare biotică. Identificarea chimică a substanței chimice testate prin denumirea IUPAC, numărul CAS, seria, lotul, formula structurală și puritatea trebuie să fie documentată atunci când este posibil.

8. Această metodă de testare poate fi utilizată în cazul substanțelor chimice solubile sau insolubile în apă. Cu toate acestea, modul de aplicare a substanței chimice testate va varia în consecință. Metoda de testare nu se aplică substanțelor chimice volatile, și anume substanțelor chimice în cazul cărora constanta Henry sau coeficientul de partiție între aer-apă este mai mare de unu sau substanțelor chimice în cazul cărora presiunea vaporilor depășește 0,0133 Pa la o temperatură de 25 °C.

VALIDITATEA TESTULUI

9. Pentru ca un rezultat al testului să fie considerat valid, grupurile de control netratate trebuie să îndeplinească următoarele criterii:

— Mortalitatea medie a adulților nu trebuie să depășească 20 % la finalul testului;

— Numărul mediu de exemplare tinere per vas trebuie să fie de cel puțin 100 la finalul testului;

— Coeficientul de variație calculat pentru numărul de exemplare tinere nu trebuie să fie mai mic de 30 % la încheierea testului definitiv.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

10. O substanță chimică de referință trebuie testată la concentrația ei EC_{50} pentru tipul de sol ales pentru test, fie la intervale regulate, fie, posibil, inclusă în fiecare efectuare de teste pentru a verifica faptul că răspunsurile organismelor testate în sistemul de testare sunt în limite normale. O substanță chimică de referință adecvată este acidul boric, care ar trebui să reducă reproducerea cu 50 % (10) (11) la o concentrație de aproximativ 100 mg/kg de sol uscat pentru ambele specii.

DESCRIEREA TESTULUI

Vasele și echipamentele de testare

11. Recipientele adecvate ca vase de testare sunt cele care pot conține 30 g de sol umed. Ele trebuie să fie fabricate din sticlă sau din plastic inert (netoxic). Cu toate acestea, utilizarea de recipiente din plastic trebuie evitată dacă expunerea substanței chimice testate este redusă din cauza absorbției. Vasele de testare trebuie să aibă o secțiunea transversală care să permită o

▼M6

adâncime a solului din vasele de testare de 2 – 4 cm. Vasele trebuie să fie prevăzute cu capace (din sticlă sau polietilenă) concepute astfel încât să reducă evaporarea apei și să permită, în același timp, schimbul gazos între sol și atmosferă. Recipientul trebuie să fie cel puțin parțial transparent pentru a permite trecerea luminii.

12. Sunt necesare echipamente de laborator obișnuite, care să includă, în mod specific, următoarele:

— dulap pentru uscare;

— microscop stereoscopic;

— pH-metru și luxmetru;

— cântare de precizie adecvate;

— echipamente adecvate pentru controlul temperaturii;

— echipamente adecvate pentru controlul umidității aerului (neesențiale în cazul în care vasele de expunere sunt acoperite cu capace);

— incubator sau o cameră mică cu temperatură controlată;

— forceps sau dispozitiv de aspirare a aerului cu putere mică.

Pregătirea solului de testare

13. Pentru testare este utilizat un sol artificial modificat (8) cu un conținut organic de 5 %. În mod alternativ, ar putea fi utilizat un sol natural, întrucât solul artificial nu este asemănător cu solul natural. Compoziția recomandată a solului artificial este următoarea (pe bază de greutăți uscate, uscare la 105 °C până la obținerea unei greutăți constante):

— 5 % mușchi de turbă, uscat la aer și măcinat fin (dimensiuni ale particulelor de 2 ± 1 mm) sunt acceptabile);

— 20 % argilă caolinică (conținutul de caolinit este preferabil să fie de peste 30 %);

— aproximativ 74 % nisip industrial uscat la aer (în funcție de cantitatea de $CaCO_3$ necesară), nisip predominant fin cu peste 50 % din particule măsurând între 50 și 200 de microni. Cantitatea exactă de nisip depinde de cantitatea de $CaCO_3$ (a se vedea mai jos), împreună trebuie să reprezinte 75 %.

— 1 % carbonat de calciu ($CaCO_3$, pulverizat, de calitate analitică) pentru a obține un pH de 6 ± 0,5; cantitatea de carbonat de calciu care trebuie adăugată poate depinde în principal de calitatea/natura turbei (a se vedea Nota 1).

Nota 1: Cantitatea de $CaCO_3$ necesară va depinde de componentele substratului de sol și trebuie determinată prin măsurarea pH-ului subeșantioanelor de sol umed preincubat imediat înainte de test.*Nota 2:* Se recomandă măsurarea pH-ului și, opțional, a raportului C/N, a capacității de schimb de cationi (CEC) și a conținutului de materie organică al solului pentru a permite normalizarea într-o etapă ulterioară și o mai bună interpretare a rezultatelor.*Nota 3:* Dacă este necesar, de exemplu în scopul unor testări specifice, solurile naturale provenite din locuri nepoluate pot servi, de asemenea, ca substrat de testare și/sau de cultură. Cu toate acestea, în cazul în care se utilizează sol natural, acesta trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea sa (locul colectării), pH, textură (distribuția dimensiunii particulelor), CEC și conținutul de materie organică și trebuie să fie necontaminat. În cazul în care se utilizează sol natural, înainte ca acesta să fie utilizat într-un test definitiv, se recomandă demonstrarea faptului că este adecvat pentru a fi utilizat în test și pentru a îndeplini criteriile de validitate a testului.

▼M6

14. Se amestecă bine constituenții uscați ai solului (de exemplu, într-un mixer de laborator de mari dimensiuni). Capacitatea maximă de retenție a apei (*water holding capacity* – WHC) a solului artificial este determinată conform procedurilor descrise în apendicele 5. Gradul de umezeală a solului de testare trebuie să fie optimizat pentru a se asigura o structură poroasă a solului care să permită colembolelor să pătrundă în pori. Acesta înseamnă în general între 40 și 60 % din capacitatea maximă de retenție a apei.

15. Solul artificial uscat este preumezit prin adăugarea unei cantități suficiente de apă deionizată pentru a obține aproximativ jumătate din conținutul final de apă cu 2-7 zile înainte de începerea testului, pentru a echilibra/stabiliza aciditatea. Pentru determinarea pH-ului, se utilizează un amestec de sol și de soluție de clorură de potasiu 1 M (KCl) sau de clorură de calciu 0,01 M ($CaCl_2$) într-un raport de 1:5 (în conformitate cu apendicele 6). Dacă aciditatea solului este mai mare decât intervalul necesar, ea poate fi ajustată prin adăugarea unei cantități adecvate de $CaCO_3$. Dacă solul este prea alcalin, el poate fi ajutat prin adăugarea unui acid anorganic nedăunător pentru colembole.

16. Solul preumezit este împărțit în porții corespunzătoare numărului de concentrații de testare (și substanței chimice de referință, dacă este cazul) și controalelor folosite în test. Se adaugă substanțele chimice testate și se ajustează conținutul de apă conform punctului 24.

Selectarea și pregătirea animalelor pentru testare

17. Specia recomandată este *F. candida*, care se reproduce partenogenetic, întrucât în testarea interlaboratoare a metodei de testare (11), această specie îndeplinește criteriile de validitate în materie de supraviețuire mai des decât specia *F. fimetaria*. În cazul utilizării unei specii alternative, ea trebuie să îndeplinească criteriile de validitate menționate la punctul 9. La începutul testului, animalele trebuie să fie bine hrănite și trebuie să aibă o vârstă cuprinsă între 23 și 26 de zile în cazul speciei *F. fimetaria* și între 9 și 12 zile în cazul speciei *F. candida*. Pentru fiecare replică, numărul exemplarelor din specia *F. fimetaria* trebuie să fie de 10 masculi și 10 femele, iar numărul exemplarelor din special *F. candida* trebuie să fie de 10 femele (a se vedea apendicele 2 și apendicele 3). Pentru fiecare lot adăugat la o replică, animalele cu dezvoltare sincronă sunt selectate în mod aleatoriu din vase, iar starea lor fizică și de sănătate este verificată. Fiecare grup de 10/20 de indivizi este adăugat într-un recipient de testare selectat în mod aleatoriu, iar femelele mari din specia *F. fimetaria* sunt selectate pentru a le putea deosebi mai ușor de masculii din aceeași specie.

Pregătirea concentrațiilor de testare

18. Pot fi utilizate patru metode de aplicare a substanțelor chimice testate: 1) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând apa drept cărăuș; 2) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând un solvent organic drept cărăuș; 3) amestecarea substanței chimice testate în sol utilizând nisipul drept cărăuș; sau 4) aplicarea substanței chimice testate pe suprafața solului. Alegerea metodei adecvate depinde de caracteristica substanței chimice și de scopul testului. În general, se recomandă amestecarea substanței chimice testate în sol. Cu toate acestea, pot fi necesare proceduri de aplicare conforme cu utilizarea practică a substanței chimice testate (pulverizarea formulărilor lichide sau utilizarea unor formulări speciale de pesticide, precum granulele sau produsele de tratare a semințelor). Solul este tratat înainte de introducerea colembolelor, cu excepția cazului în care substanța chimică testată este adăugată la suprafața solului, colembolele trebuind să intre în sol.

Substanța chimică testată solubilă în apă

19. O soluție a substanței chimice testate este pregătită în apă deionizată într-o cantitate suficientă pentru toate replicile cu o concentrație de testare. Fiecare soluție de substanță testată se amestecă bine cu un lot de sol preumezit înainte de a fi introdusă în vasul de testare.

Substanța chimică testată insolubilă în apă

20. În ceea ce privește substanțele chimice insolubile în apă, dar solubile în solvenți organici, substanța chimică testată poate fi dizolvată în cel mai

▼M6

mic volum posibil de solvent adecvat (de exemplu, acetonă) asigurând în continuare amestecarea corespunzătoare a substanței chimice în sol, precum și amestecarea ei cu o porție necesară de nisip de cuarț. Trebuie utilizați numai solvenți volatili. În cazul în care este utilizat un solvent organic, toate concentrațiile de testare și un control negativ cu solvent suplimentar trebuie să conțină aceeași cantitate minimă de solvent. Recipientele pentru aplicare trebuie să fie lăsate descoperite o anumită perioadă de timp pentru a permite solventului asociat cu aplicarea substanței chimice testate să se evapore, asigurându-se că, în acest timp, nu are loc disiparea substanței chimice toxice.

Substanță chimică testată puțin solubilă în apă și în solvenți organici

21. În ceea ce privește substanțele chimice puțin solubile în apă și în solvenții organici, nisipul de cuarț, care trebuie să fie o parte din nisipul total adăugat în sol, se amestecă cu cantitatea de substanță chimică testată pentru a obține concentrația de testare dorită. Acest amestec de nisip de cuarț și de substanță chimică testată se adaugă la solul preumezit și se amestecă bine după ce a fost adăugată o cantitate corespunzătoare de apă deionizată pentru a se obține conținutul de umiditate dorit. Amestecul final este distribuit în vasele de testare. Se repetă procedura pentru fiecare concentrație de testare și se pregătește, de asemenea, un control corespunzător.

Aplicarea substanței chimice testate pe suprafața solului

22. Atunci când substanța chimică testată este un pesticid, poate fi adecvat ca aceasta să fie aplicată pe suprafața solului prin pulverizare. Solul este tratat după adăugarea colembolelor. Recipientele de testare sunt în primul rând umplute cu substratul de sol umezit, apoi se introduc animalele, iar ulterior se cântăresc recipientele de testare. Pentru a evita orice expunere prin contact direct a animalelor la substanța chimică testată, aceasta se aplică la cel puțin jumătate de oră după introducerea colembolelor. Substanța chimică testată trebuie aplicată pe suprafața solului în mod cât mai uniform posibil, cu ajutorul unui dispozitiv de pulverizare de laborator pentru a simula pulverizarea pe teren. Aplicarea trebuie să aibă loc la o temperatură de ± 2 °C, iar pentru soluțiile apoase, emulsii sau dispersii, cu o rată de aplicare a apei în conformitate cu recomandările de evaluare a riscurilor. Rata trebuie să fie verificată cu ajutorul unei tehnici de calibrare adecvate. Formulările speciale, precum granulele sau produsele de tratare a semințelor, ar putea fi aplicate într-un mod similar cu modul de aplicare în agricultură. Hrana este adăugată după pulverizare

PROCEDURA

Condițiile de testare

23. Temperatura medie de testare trebuie să fie de 20 ± 1 °C, cu un interval de temperatură de 20 ± 2 °C. Testul este efectuat în cicluri de lumină și de întuneric controlate (de preferință 12 ore de lumină și 12 ore de întuneric) cu o intensitate a luminii cuprinsă între 400 și 800 lux în aria în care se află vasele de testare.

24. Pentru a verifica umiditatea solului, vasele sunt cântărite la începutul, la jumătatea și la sfârșitul testului. Orice pierdere de greutate de > 2 % este compensată prin adăugarea de apă deionizată. Trebuie remarcat că pierderea de apă poate fi redusă prin menținerea unei umidități mari a aerului (> 80 %) în incubatorul de testare.

25. pH-ul trebuie măsurat la începutul și la sfârșitul testului de stabilire a intervalului și ale testului definitiv. Măsurătorile trebuie să fie realizate într-un eșantion de control suplimentar și într-un eșantion suplimentar al eșantioanelor de sol tratate (toate concentrațiile) pregătite și menținute în același mod ca în culturile de testare, dar fără adăugarea de colembole.

Procedură de testare și măsurători

26. Pentru fiecare concentrație de testare, o cantitate de sol de testare corespunzătoare unei cantități de 30 g de greutate umedă este plasată în vasul de

▼M6

testare. Sunt pregătite, de asemenea, controale de apă, fără substanța chimică testată. În cazul utilizării unui vehicul pentru aplicarea substanței chimice testate, o serie de control care conține doar vehiculul trebuie să fie realizată în plus față de seria de testare. Concentrația solventului sau a agentului de dispersie trebuie să fie egală cu cea utilizată în vasele de testare care conțin substanța chimică testată.

27. Colembolele individuale sunt transferate cu atenție în fiecare vas de testare (alocate în mod aleatoriu vaselor de testare) și sunt plasate pe suprafața solului. Pentru un transfer eficient al animalelor, poate fi utilizat un dispozitiv de aspirare a aerului cu putere mică. Numărul de replici pentru concentrațiile de testare și pentru controale depinde protocolul testului utilizat. Vasele de testare sunt poziționate în mod aleatoriu în incubatorul de testare, respectivele poziții fiind modificate aleator săptămânal.

28. Pentru testul cu *F. fimetaria* trebuie să se utilizeze douăzeci de adulți per vas de testare, 10 masculi și 10 femele, cu vârste cuprinse între 23 și 26 de zile. În ziua 21, colembolele sunt extrase din sol și numărate. Pentru *F. fimetaria* genul este determinat în funcție de dimensiuni în lotul de animale cu dezvoltare sincronă utilizate pentru testare. Femelele sunt evident mai mari decât masculii (a se vedea apendicele 3).

29. Pentru testul cu *F. candida* trebuie utilizate zece exemplare tinere, cu vârsta de 9– 12 zile, per vas de testare. În ziua 28, colembolele sunt extrase din sol și numărate.

30. Ca sursă adecvată de hrană, o cantitate suficientă, și anume 2 – 10 mg de drojdie uscată granulată, disponibilă în comerț pentru uz casnic, se adaugă în fiecare recipient la începutul testului și după aproximativ 2 săptămâni.

31. La sfârșitul testului, sunt evaluate mortalitatea și reproducerea. După 3 săptămâni (*F. fimetaria*) sau după 4 săptămâni (*F. candida*), colembolele sunt extrase din solul de testare (a se vedea apendicele 4) și numărate (12). O colembolă este înregistrată ca fiind moartă dacă nu este prezentă în extracție. Metoda de extragere și numărare trebuie să fie validate. Validitatea include eficiența extracției exemplarelor tinere mai mare de 95 %, de exemplu prin adăugarea unui număr cunoscut de exemplare în sol.

32. Rezumatul practic și calendarul procedurii de testare sunt descrise în apendicele 2.

Protocolul testului

Testul de stabilire a intervalului

33. Atunci când este necesar, se realizează un test de stabilire a intervalului cu, de exemplu, cinci concentrații ale substanțelor chimice testate de 0,1, 1, 10, 100 și 1 000 mg/kg greutate uscată a solului și două replici pentru fiecare tratament și control. Informații suplimentare, provenite din teste cu substanțe chimice similare sau din literatura de specialitate, privind mortalitatea sau reproducerea colembolelor pot fi de asemenea utile în alegerea intervalului concentrațiilor care urmează să fie utilizate în testul de stabilire a intervalului.

34. Durata testului de stabilire a intervalului este de două săptămâni pentru *F. fimetaria* și de 3 săptămâni pentru *F. candida* pentru a asigura producerea unei serii de exemplare tinere. La sfârșitul testului, sunt evaluate mortalitatea și reproducerea colembolelor. Numărul adulților și apariția exemplarelor tinere trebuie înregistrate.

Testul definitiv

35. Pentru stabilirea valorii EC_x (de exemplu, EC_{10}, EC_{50}), trebuie testate douăsprezece concentrații. Se recomandă cel puțin două replici pentru fiecare concentrație de testare și șase replici de control. Factorul de spațiere poate varia în funcție de tipul de relație doză-răspuns.

▼M6

36. Pentru stabilirea NOEC/LOEC, trebuie testate cel puțin cinci concentrații într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru replici pentru fiecare concentrație de testare și opt controale. Concentrațiile trebuie să fie spațiate printr-un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

37. O metodă combinată permite determinarea valorilor NOEC/LOEC și ECx. Pentru această metodă combinată, trebuie utilizate opt concentrații de tratament într-o serie geometrică. Se recomandă utilizarea a patru replici pentru fiecare tratament și opt controale. Concentrațiile trebuie să fie spațiate printr-un factor care să nu depășească valoarea de 1,8.

38. În cazul în care nu este observat niciun efect la cea mai înaltă concentrație în cadrul testului de stabilire a intervalului (și anume 1 000 mg/kg), testul de reproducere poate fi realizat ca test limită utilizând o concentrație de testare de 1 000 mg/kg și controlul. Un test limită va oferi posibilitatea de a demonstra că nu există un efect semnificativ din punct de vedere statistic la concentrația limită. Trebuie utilizate opt replici atât pentru solul tratat, cât și pentru control.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

39. Producția reproductivă reprezintă principalul parametru studiat (de exemplu numărul de exemplare tinere produse per vas de testare). Analiza statistică, de exemplu procedurile ANOVA, compară tratamentele prin intermediul testelor Student t, Dunnett sau Williams. Intervalul de încredere de 95 % se calculează pentru mediile tratamentelor individuale.

40. Numărul de adulți supraviețuitori din vasele de control netratate reprezintă un criteriu de validitate important și trebuie documentat. Ca și în cazul testului de stabilire a intervalului, toate celelalte semne nocive trebuie înregistrate și în raportul final.

LC_x și EC_x

41. Valorile EC_x, inclusiv limitele lor de încredere de 95 % inferioară și superioară corespunzătoare parametrului se calculează utilizând metode statistice adecvate (de exemplu, funcția logistică sau Weibull, metoda Spearman-Karber simplificată sau simpla interpolare). O valoare EC_x se obține prin inserarea unei valori corespunzătoare la x % din media controalelor în ecuația respectivă. Pentru calcularea valorii EC_{50} sau a oricărei alte valori EC_x, seturile de date complete trebuie supuse unei analize de regresie. LC_{50} este de obicei estimată prin analiza *probit* sau o analiză similară care ține cont de datele privind mortalitatea distribuite binominal.

NOEC/LOEC

42. În cazul în care se intenționează determinarea valorii NOEC/LOEC prin analiză statistică, sunt necesare statistici pentru fiecare vas (fiecare vas este considerat o replică). Trebuie utilizate metode statistice adecvate conform Documentului 54 al OCDE intitulat „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*: *a Guidance to Application*” (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind exotoxicitatea: orientări de aplicare) (9). În general, efectele adverse ale substanței chimice testate în raport cu controlul sunt analizate utilizând testarea unilaterală a ipotezei la $p \leq 0,05$.

43. Distribuția normală și omogenitatea variației pot fi testate cu ajutorul unui test statistic adecvat, de exemplu testul Shapiro-Wilk și, respectiv, testul Levene ($p \leq 0,05$). Se pot efectua o analiză a variației unidirecțională (ANOVA) și teste multicomparative ulterioare. Comparațiile multiple (de

▼M6

exemplu, testul Dunnett) sau testele tendinței regresive (de exemplu, testul Williams) pot fi utilizate pentru calcularea eventualelor diferențe semnificative ($p \leq 0,05$) între controale și diversele concentrații de substanță chimică testată [selectarea testului recomandat conform Documentului 54 al OCDE (9)]. În caz contrar, ar putea fi utilizate metode neparametrice (de exemplu, testul Bonferroni U conform testului tendinței regresive Holm sau Jonckheere-Terpstra) pentru determinarea NOEC și a LOEC.

Test limită

44. În cazul în care a fost efectuat un test imită (compararea controlului cu un singur tratament) și au fost îndeplinite condițiile prealabile ale procedurilor de testare parametrice (normalitate, omogenitate), pot fi evaluate răspunsurile metrice prin intermediul testului Student (testul t). Se poate utiliza testul t pentru varianțe inegale (testul Welch t) sau un test neparametric, precum testul Mann-Whitney u, în cazul în care nu sunt îndeplinite aceste cerințe.

45. Pentru determinarea diferențelor semnificative între controale (control și control cu solvent), replicile fiecărui control pot fi testate conform descrierilor pentru testul limită. În cazul în care aceste teste nu detectează nicio diferență semnificativă, toate replicile cu control și control cu solvent pot fi comasate. În caz contrar, toate tratamentele trebuie comparate cu controlul cu solvent.

Raportul privind testul

46. Raportul privind testul trebuie să includă cel puțin următoarele informații:

Substanța chimică testată

— identitatea substanței chimice testate, lotul de fabricație, lotul de ambalare și numărul CAS, puritatea;

— proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice testate [de exemplu, log Kow, solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, constanta Henry (H) și, de preferință, informații privind soarta substanței chimice testate în sol), dacă sunt disponibile;

— formularea substanței chimice testate și a aditivilor trebuie specificate dacă nu este testată substanța chimică pură;

Organismele testate

— identificarea speciilor și a furnizorului organismelor testate, descrierea condițiilor de reproducere și intervalul de vârstă al organismelor testate;

Condițiile de testare

— descrierea protocolului și a procedurii experimentale;

— detalii privind pregătirea solului de testare; specificații detaliate în cazul în care se utilizează sol natural (origine, istoric, distribuția dimensiunii particulelor, pH, conținut de materie organică);

— capacitatea solului de retenție a apei;

— descrierea tehnicii utilizate pentru aplicarea substanței chimice testate în sol;

— condiții de testare: intensitatea luminii, durata ciclurilor lumină-întuneric, temperatura;

— o descriere a regimului de hrănire, tipul și cantitatea hranei utilizate în cadrul testului, datele hrănirii;

— pH-ul și conținutul de apă din sol la începutul și la sfârșitul testului (control și fiecare tratament);

— o descriere detaliată a metodei de extracție și eficiența extracției;

▼M6

Rezultatele testului

— numărul de exemplare tinere determinat în fiecare vas de testare la sfârșitul testului;

— numărul de exemplare adulte și rata mortalității în rândul acestora (%) în fiecare vas de testare la sfârșitul testului;

— o descriere a simptomelor fiziologice sau patologice evidente sau schimbările evidente de comportament;

— rezultatele obținute cu substanța chimică testată de referință;

— valorile NOEC/LOEC, LC_x pentru mortalitate și EC_x pentru reproducere (în principal LC_{50}, LC_{10}, EC_{50} și EC_{10}) împreună cu intervalele de încredere de 95 %. Un grafic al modelului ajustat folosit în calcule, ecuația funcției sale și parametrii acestuia [a se vedea alineatul (9)];

— toate informațiile și observațiile utile pentru interpretarea rezultatelor;

— puterea testului efectiv dacă se realizează testarea ipotezei (9);

— abaterile de la procedurile descrise în prezenta metodă de testare și orice eveniment neobișnuit survenit pe parcursul testului;

— validitatea testului;

— pentru NOEC, dacă este estimată, diferența minimală detectabilă.

BIBLIOGRAFIE

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 pp (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268

(8) Chapter C.36 of this Annex, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil.*

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

Apendicele 1

Definiții

Următoarele definiții se aplică acestei metode de testare (în cadrul acestui test, toate concentrațiile pentru care se observă efecte sunt exprimate ca masă a substanței chimice testate raportată la masa uscată a solului de testare):

Substanța chimică este o substanță sau un amestec.

NOEC (concentrație la care nu se observă niciun efect) înseamnă concentrația substanței chimice testate în cazul căreia nu se observă niciun efect. În cadrul acestui test, concentrația corespunzătoare NOEC nu prezintă niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu controlul.

LOEC (concentrația cea mai mică la care este observat un efect) reprezintă concentrația cea mai mică a substanței chimice testate care are un efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu controlul.

ECx (concentrație la care se observă x % efect) înseamnă concentrația care determină un efect de x % asupra organismelor testate pe parcursul unei perioade de expunere date comparativ cu un control. De exemplu, o EC_{50} reprezintă o concentrație pentru care se estimează că determină un efect asupra unui parametru studiat în test la 50 % dintr-o populație expusă pe parcursul unei perioade de expunere definite.

Substanța chimică testată este orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼M6

Apendicele 2

Principalele acțiuni și calendarul pentru realizarea unui test asupra colembolelor

Etapele testului pot fi rezumate după cum urmează:

Timp (zile)	Acțiune
– 23 – – 26	Pregătirea culturii de *F. fimetaria* cu dezvoltare sincronă
– 14	Pregătirea solului artificial (amestecul de constituenți uscați) Se verifică pH-ul solului artificial și se ajustează în consecință Se măsoară WHC maximă a solului
– 9 – – 12	Pregătirea culturii de *F. candida* cu dezvoltare sincronă
– 2 – – 7	Se preumezește solul
– 1	Se distribuie exemplarele tinere în loturi Se prepară soluțiile stoc și se aplică substanța chimică testată dacă solventul este necesar
0	Se prepară soluții stoc și se aplică substanța chimică testată dacă este necesară aplicarea de substanțe chimice solide, solubile în apă sau pe suprafață. Se măsoară pH-ul solului și se cântăresc recipientele. Se adaugă hrană. Se introduc colembolele.
14	Test de determinare a intervalului *F. fimetaria*: Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate) Testele definitive: Se măsoară conținutul de umiditate și se realimentează cu apă și se adaugă 2 – 10 mg de drojdie
21	Test definitiv pentru *F. fimetaria*: Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate) Test de determinare a intervalului *F. candida*: Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate)
28	Test definitiv pentru *F. candida*: Se încheie testul, se extrag animalele, se măsoară pH-ul solului și pierderea de apă (greutate)

▼M6

Apendicele 3

Orientări pentru creșterea și sincronizarea *F. fimetaria* și a *F. candida*

Timpii și duratele indicate în aceste orientări trebuie verificate pentru fiecare tulpină specifică de colembole pentru a se asigura exemplare tinere suficient de sincronizate. În principiu, incidența depunerii ouălor după ce adulții sunt transferați în substrat proaspăt și eclozarea ouălor determină ziua adecvată pentru colectarea ouălor și a exemplarelor tinere sincrone.

Se recomandă dispunerea în permanență de o cultură stoc care să conțină de exemplu 50 de recipiente/placă Petri. Cultura stoc trebuie să fie menținută în bune condiții de hrănire prin hrănire săptămânală, alimentare cu apă și îndepărtarea hranei vechi și a cadavrelor. Prea puține colembole pe substrat pot conduce la inhibare printr-o creștere mai accentuată a fungilor. Dacă cultura stoc este utilizată prea des pentru producerea de ouă, ea riscă se să devină mai ineficientă. Semnele de ineficiență sunt adulți morți și prezența fungilor pe substrat. Ouăle rămase în urma producerii de animale sincrone pot fi folosite pentru a reîntineri cultura.

Într-o cultură sincronizată de *F. fimetaria*, masculii se disting de femele mai ales prin dimensiune. Masculii sunt în mod clar mai mici decât femelele, iar viteza de deplasare a masculilor este mai mare decât cea a femelelor. Selectarea corectă a genului necesită puțină practică și poate fi confirmată prin inspecția microscopică a zonei genitale (13).

1. **Creșterea**

1.a. *Pregătirea substratului de cultură*

Substratul de cultură este constituit din ipsos de Paris (sulfat de calciu) și cărbune activ. Se obține astfel un substrat umed, funcția cărbunelui fiind cea de a absorbi gazele și excrementele (14) (15). Pentru a facilita observația colembolelor pot fi utilizat diferite forme de cărbune. De exemplu, pulberea de cărbune este utilizată pentru *F. candida* și *F. fimetaria* (producând un ipsos de Paris negru/gri).

Constituenții substratului:

— 20 ml de cărbune activ

— 200 ml de apă distilată

— 200 ml de ipsos de Paris

sau

— 50 g de cărbune activ pulverizat

— 260 – 300 ml de apă distilată

— 400 g de ipsos de Paris

Amestecul de substrat se lasă să se aşeze înainte de utilizare.

1.b. *Reproducerea*

Colembolele sunt ținute în recipiente precum placa Petri (90 mm × 13 mm) cu fundul acoperit cu un strat de ipsos/substrat de cărbune de 0,5 cm. Ele sunt cultivate la 20 ± 1 °C la un ciclu lumină-întuneric de 12 – 12 ore (400 – 800 lux). Recipientele sunt menținute în permanență umede, asigurându-se că umiditatea relativă a aerului din recipiente este de 100 %. Aceasta poate fi garantată prin prezența apei libere în ipsosul poros, dar cu evitarea generării unui film de apă pe suprafața ipsosului. Pierderea de apă poate

▼M6

fi prevenită prin asigurarea unui aer ambiant umed. Toți indivizii morți trebuie să fie îndepărtați din recipiente, la fel ca și hrana mucegăită. Pentru a stimula producția de ouă este necesar ca exemplarele adulte să fie transferate în plăci Petri prevăzute cu ipsos de Paris/substrat de cărbune proaspăt pregătit.

1.c. *Sursa de hrană*

Drojdia uscată granulată este folosită ca unică sursă de hrană pentru ambele specii, *F. candida* și *F fimetaria*. Hrana proaspătă este administrată o dată sau de două ori pe săptămână, pentru a evita mucegăirea acesteia. Ea este plasată direct pe ipsosul de Paris sub forma unei mici grămezi. Masa de drojdie adăugată trebuie să fie ajustată în funcție de dimensiunea populației de colembole, însă, în general, o cantitate de 2 – 15 mg este suficientă.

2. **Sincronizarea**

Testul trebuie efectuat cu exemplare sincronizate pentru a obține animale de testare omogene în stadiu și cu dimensiuni identice. În plus, sincronizarea permite deosebirea masculilor și a femelelor de *F. fimetaria* începând cu vârsta de 3 săptămâni și ulterior pe baza dimorfismului sexual, adică a diferențelor de dimensiune. Procedura de mai jos reprezintă o sugestie privind modul în care se pot obține animale sincronizate (etapele practice sunt opționale).

2.a. *Sincronizarea.*

— Se pregătesc recipiente cu un strat de ipsos de Paris/substrat de cărbune de 0,5 cm.

— Pentru depunerea de ouă, se transferă 150 – 200 de adulți de *F. fimetaria* și 50 – 100 de adulți de *F. candida* din cele mai bune 15 – 20 de recipiente cu cultură stoc cu substrat vechi de 4 – 8 săptămâni și se hrănesc cu 15 mg de drojdie. Trebuie evitată comasarea exemplarelor tinere și a adulților, deoarece exemplarele tinere pot inhiba producerea de ouă.

— Mediul de cultură se menține la 20 ± 1 °C (media trebuie să fie de 20 °C) și la un ciclu de lumină-întuneric de 12 – 12 ore (400 – 800 lux). Se asigură că este disponibilă hrană proaspătă și că aerul este saturat cu apă. Lipsa de hrană poate determina animalele să elimine materialele fecale pe ouă, acest lucru având ca rezultat dezvoltarea de fungi pe ouă sau *F. candida* își poate canibaliza propriile ouă. După 10 zile, ouăle sunt colectate cu grijă cu ajutorul unui ac și al unei spatule și sunt mutate în „cofraje de ouă” (bucăți mici de hârtie de filtru imersate în ipsos de Paris/suspensie de cărbune) care sunt plasate într-un recipient cu un substrat proaspăt de ipsos/cărbune. Câteva granule de drojdie sunt adăugate substratului pentru a atrage exemplarele tinere și pentru a le determina să părăsească cofrajele de ouă. Este important ca atât cofrajele de ouă cât și substratul să fie umede, altfel ouăle se vor deshidrata. Ca alternativă, animalele adulte pot fi îndepărtate din cutiile de cultură de sincronizare după ce produc ouă timp de 2 sau 3 zile.

— După trei zile, cea mai mare parte a ouălor din cofraje vor fi eclozate și sub cofraj pot fi găsite exemplare tinere.

— Pentru a avea exemplare tinere de aceeași vârstă, cofrajele cu ouă neeclozate se îndepărtează din placa Petri cu forcepsul. Exemplarele tinere, de 0 – 3 zile, rămân în placă și sunt hrănite cu drojdie. Ouăle neeclozate sunt eliminate.

— Ouăle și exemplarele tinere eclozate se cultivă în același mod ca exemplarele adulte. În special pentru *F. fimetaria* trebuie luate următoarele măsuri: se asigură hrană proaspătă suficientă, îndepărtarea hranei vechi mucegăite, după 1 săptămână exemplarele tinere sunt împărțite în noi plăci Petri cu condiția ca densitatea să fie de peste 200.

▼M6

2.b. *Manipularea colembolelor la începerea testului*

— Se colectează exemplare de *F. candida* cu vârste cuprinse între 9 și 12 zile și de *F. fimetaria* cu vârste cuprinse între 23 și 26 de zile, de exemplu prin aspirare, și sunt eliberate într-un recipient de mici dimensiuni cu un substrat de ipsos/cărbune umed, starea lor fizică fiind verificată cu ajutorul unui microscop binocular (animalele lezate sau deteriorate sunt eliminate). Toate etapele trebuie realizate în condiții de menținere a colembolelor într-o atmosferă umedă, pentru a evita stresul cauzat de uscare, de exemplu, prin utilizarea de suprafețe umezite, etc.

— Recipientul se răstoarnă și se lovește ușor pentru a transfera colembolele pe sol. Electricitatea statică trebuie neutralizată, în caz contrar animalele pot zbura în aer sau pot rămâne pe partea laterală a containerului de testare și se pot usca. Pentru neutralizare poate fi folosit un ionizator sau o pânză umedă sub recipient.

— Hrana trebuie răspândită pe toată suprafața solului și nu plasată ca o singură grămadă.

— În timpul transportului și în timpul perioadei de testare trebuie să se evite lovirea sau perturbarea în alt mod fizic a recipientelor de testare, deoarece se poate crește compactarea solului și se poate împiedica interacțiunea dintre colembole.

3. **Specii de colembole alternative**

Conform acestei metode de testare, pot fi selectate alte specii de colembole pentru testare, precum Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta. Înainte de utilizarea speciilor alternative, trebuie îndeplinite o serie de condiții prealabile:

— Ele trebuie să fie identificate fără echivoc;

— Trebuie furnizată argumentația care stă la baza selectării respectivelor specii;

— Trebuie să se asigure că biologia de reproducere este inclusă în faza de testare și că astfel va fi o țintă potențială în timpul expunerii;

— Trebuie cunoscut ciclul biologic de viață: vârsta la maturitate, durata dezvoltării ouălor și stadiile care fac obiectul expunerii;

— Condițiile optime de creștere și de reproducere trebuie asigurate de substratul de testare și de aprovizionarea cu hrană;

— Variabilitatea trebuie să fie suficient de mică pentru o estimare precisă și exactă a toxicității.

▼M6

Apendicele 4

Extragerea și numărarea animalelor

1. **Pot fi aplicate două metode de extragere.**

1.a. Prima metodă: Poate fi utilizat un extractor cu gradient de temperatură controlat, pe baza principiilor MacFadyen (1). Căldura care provine de la un element de încălzire situat în partea superioară a cutiei de extragere (reglată printr-un termistor plasat pe suprafața eșantionului de sol). Temperatura din lichidul răcit care înconjoară vasul de colectare este reglată printr-un termistor plasat la suprafața cutiei de colectare (sub miezul solului). Termistoarele sunt conectate la o unitate de controlare programabilă care crește temperatura în funcție un calendar preprogramat. Animalele sunt colectate în cutia de colectare răcită (2 °C) care este prevăzută pe fund cu un strat din ipsos de Paris/cărbune. Extragerea este începută la 25 °C, temperatura fiind crescută automat la fiecare 12 ore cu 5 °C, ea durând în total 48 de ore. După 12 ore la 40 °C extragerea este finalizată.

1.b. A doua metodă: După perioada de incubare experimentală se evaluează prin flotație numărul de colembolelor tinere prezente. În acest scop, testul se efectuează în vase cu un volum de aproximativ 250 ml. La sfârșitul testului, se adaugă aproximativ 200 ml de apă distilată. Solul este agitat ușor cu o pensulă fină pentru a permite colembolelor să plutească la suprafața apei. O cantitate mică, de aproximativ 0,5 ml de vopsea Kentmere neagră fotografică poate fi adăugată în apă pentru a ajuta la numărare prin creșterea contrastului dintre apă și colembolele albe. Vopseaua nu este toxică pentru colembole.

2. **Numărarea:**

Numărarea se poate face cu ochiul liber sau sub un microscop optic cu ajutorul unei grile plasate deasupra vasului de plutire sau prin fotografierea suprafeței fiecărui vas și numărarea ulterioară a colembolelor pe imagini tipărite mărite sau imagini proiectate. Numărarea poate fi realizată și cu ajutorul tehnicilor digitale de prelucrare a imaginilor (12). Toate tehnicile trebuie să fie validate.

▼M6

Apendicele 5

Determinarea WHC maxime a solului

Următoarea metodă pentru determinarea capacității maxime a solului de retenție a apei (WHC) este considerată a fi una adecvată. Ea este descrisă în anexa C din ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction). [Calitatea solului – Efectele poluanților asupra râmelor (*Eisenia fetida*). Partea 2: Determinarea efectelor asupra reproducerii].

Se colectează o cantitate definită (de exemplu, 5 g) din substratul de sol de testare cu ajutorul unui dispozitiv de prelevare adecvat (tub cu sfredel etc.). Se acoperă fundul tubului cu o bucată de hârtie de filtru umedă și apoi se așează pe un suport într-o baie de apă. Tubul trebuie scufundat treptat până când nivelul apei depășește nivelul solului. El trebuie apoi lăsat în apă timp de aproximativ trei ore. Întrucât nu toată apa absorbită de capilarele solului poate fi reținută, eșantionul de sol trebuie lăsat să dreneze timp de două ore prin plasarea tubului pe un pat de nisip de cuarț fin măcinat și foarte umed într-un vas acoperit (pentru a preveni uscarea). Eșantionul trebuie apoi să fie cântărit, uscat până la masa constantă la 105 °C. Capacitatea de retenție a apei (*water holding capacity* – WHC) se calculează după cum urmează:

$$\text{WHC (în \% de masă uscată)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

unde:

S = masa substratului saturat cu apă + masa tubului + masa hârtiei de filtru

T = tara (masa tubului + masa hârtiei de filtru)

D = masa uscată a substratului

▼**M6**

Apendicele 6

Determinarea pH-ului solului

Următoarea metodă pentru determinarea pH-ului solului se bazează pe descrierea din ISO DIS 10390: Calitatea solului – Determinarea pH-ului.

O cantitate definită de sol este uscată la temperatura camerei timp de cel puțin 12 ore. Se prepară apoi o suspensie de sol (conținând cel puțin 5 grame de sol) într-o cantitate echivalentă cu de cinci ori volumul său de soluție de clorură de potasiu (KCl) 1 M de puritate analitică sau de soluție de clorură de calciu ($CaCl_2$) 0,01 M de puritate analitică. Suspensia este apoi agitată puternic timp de cinci minute, apoi se lasă să se decanteze timp de cel puțin 2 de ore, dar nu mai mult de 24 de ore. pH-ul fazei lichide este apoi măsurat cu ajutorul unui pH-metru care a fost etalonat înainte de fiecare măsurătoare folosind o serie de soluții tampon adecvate (de exemplu, pH 4 și 7).

▼M6

C.40. **TEST DE TOXICITATE PE CHIRONOMIDE CARE CUPRINDE CICLUL DE VIAȚĂ DESFĂȘURAT ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT UTILIZÂND APĂ ADIȚIONATĂ SAU SEDIMENT ADIȚIONAT**

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 233 (2010). Este concepută pentru a evalua efectele expunerii pe tot parcursul vieții a substanțelor chimice asupra *Chironomus* sp., un dipter de apă dulce, acoperind complet prima generație (generația P) și prima parte a celei de a 2-a generații (generația F1). Metoda este o extindere a metodelor de testare C.28 (1) sau C.27 (15) existente în cadrul unui scenariu de expunere la apă adiționată sau, respectiv, la sediment adiționat. Ia în considerare actualele protocoale de testare a toxicității pentru *Chironomus riparius* și *Chironomus dilutus* [denumit anterior *C. tentans* (2)], care au fost dezvoltate în Europa și în America de Nord (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) și ulterior supuse unor testări interlaboratoare (1) (7) (10) (11) (12). Se pot utiliza și alte specii de chironomide bine documentate, de exemplu *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Durata completă de expunere este de circa 44 de zile pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* și de circa 100 de zile pentru *C. dilutus*.

2. Ambele scenarii de expunere, la apă și la sediment, sunt descrise în această metodă de testare. Selectarea unui scenariu de expunere adecvat depinde de aplicarea preconizată a testului. Scenariul de expunere la apă, care implică adiționarea coloanei de apă, este menit să simuleze o pulverizare cu pesticide și acoperă concentrația maximă inițială în apele de suprafață. Apa adiționată este utilă și pentru alte tipuri de expunere (inclusiv deversări de substanțe chimice), dar nu și pentru procesele de acumulare în sediment cu o durată mai mare decât durata testării. În acest caz, dar și în cazul în care deversarea reprezintă principala cale de intrare a pesticidelor în acumulările de apă, poate fi mai adecvat un test cu sediment adiționat. Dacă sunt avute în vedere alte scenarii de expunere, protocolul de testare poate fi adaptat cu ușurință. De exemplu, dacă distribuția substanței chimice testate între faza apoasă și stratul de sediment nu este de interes și dacă absorbția în sediment trebuie să fie redusă la minimum, poate fi luată în considerare utilizarea unui sediment artificial surogat (de exemplu, nisip de cuarț).

3. Substanțele chimice care necesită testarea organismelor care trăiesc în sedimente pot persista în sediment un timp îndelungat. Organismele care trăiesc în sedimente pot fi expuse prin mai multe căi. Importanța relativă a fiecărei căi de expunere, precum și timpul necesar pentru ca fiecare să contribuie la efectul toxic general, depind de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice respective. Pentru substanțele chimice puternic absorbante sau pentru substanțele chimice care se leagă covalent de sediment, ingerarea de hrană contaminată poate fi o cale de expunere semnificativă. Pentru a nu subestima toxicitatea substanțelor chimice puternic lipofile, se poate lua în considerare adăugarea de hrană la sediment înainte de aplicarea substanței chimice testate (a se vedea punctul 31). Prin urmare, este posibil să se includă toate căile de expunere și toate etapele de viață.

4. Parametri studiați măsurați sunt numărul total de adulți eclozați (pentru prima și a doua generație), rata de dezvoltare (pentru prima și a doua generație), raportul sexelor adulților eclozați și vii (pentru prima și a doua generație), numărul de șiraguri de ouă per femelă (doar prima generație) și fertilitatea șiragurilor de ouă (doar prima generație).

5. Sedimentul formulat este foarte recomandat. Sedimentul formulat are o serie de avantaje față de sedimentele naturale:

▼M6

— variabilitatea experimentală este redusă, pentru că formează o „matrice standardizată” cu caracter reproductibil și se elimină necesitatea găsirii de surse de sedimente necontaminate și curate;

— testele pot fi inițiate în orice moment, fără a întâmpina problema variabilității sezoniere în sedimentul de testare și nu este necesară pretratarea sedimentului pentru a elimina fauna indigenă;

— reducerea costului în raport cu costul necesar pentru colectarea pe teren de cantități suficiente necesare pentru testarea de rutină;

— sedimentul formulat permite comparații ale toxicității între studii și clasificarea substanțelor chimice în consecință (3).

6. Definițiile utilizate sunt furnizate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Chironomidele în primul stadiu larvar sunt expuse la o gamă de concentrații de substanță chimică testată într-un sistem apă-sediment. Testul începe prin introducerea chironomidelor în primul stadiu larvar (prima generație) în pahare de laborator pentru testare care conțin sediment adiționat sau, alternativ, substanța chimică testată este adiționată în apă după introducerea larvelor. Sunt evaluate eclozarea chironomidelor, timpul până la eclozare și raportul sexelor chironomidelor complet eclozate și vii. Adulții eclozați sunt transferați în cuști de reproducere, pentru a facilita formarea roiurilor, împerecherea și depunerea ouălor. Sunt evaluate numărul de șiraguri de ouă produse și fertilitatea lor. Din aceste șiraguri de ouă, se obțin larve în primul stadiu din a 2-a generație. Aceste larve sunt introduse în pahare de laborator proaspăt pregătite (procedură de adiționare la fel ca în cazul primei generații) pentru a determina viabilitatea celei de a 2-a generații prin evaluarea eclozării lor, a timpului până la eclozare și a raportului sexelor chironomidelor complet eclozate și vii (o prezentarea schematică a testului care cuprinde ciclul de viață este furnizată în apendicele 5). Toate datele sunt analizate fie printr-un model de regresie pentru a estima concentrația care ar conduce la reducerea cu X % a parametrului studiat relevant, fie prin testarea ipotezei pentru a determina o concentrație fără efecte observate (NOEC). Cea din urmă implică compararea răspunsurilor la tratament cu răspunsurile controlului adecvat cu ajutorul unor teste statistice. Trebuie remarcat faptul că în scenariul bazat pe apa adiționată, în cazul substanțelor chimice cu degradare rapidă, ultimele stadii ale ciclului viață al fiecărei generații (de exemplu, faza pupală) ar putea fi expuse la un nivel al concentrației considerabil mai redus în apa acoperitoare în raport cu chironomidele în primul stadiu larvar. Dacă aceasta reprezintă o preocupare și dacă este necesar un nivel de expunere comparabil pentru fiecare stadiu de viață, ar putea fi luate în considerare următoarele modificări ale metodei de testare:

— testări paralele cu adiționare în diferite stadii de viață sau

— adiționare repetată (sau înnoirea apei acoperitoare) a sistemului de testare pe durata ambelor etape de testare (prima și a 2-a generație), prin care intervalele de adiționare (de înnoire) trebuie să fie ajustate la caracteristicile sorției substanței chimice testate.

Astfel de modificări sunt fezabile doar în scenariul bazat pe apă adiționată, dar nu și în cel bazat pe sediment adiționat.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

8. Trebuie să fie cunoscute solubilitatea în apă a substanței chimice testate, presiunea vaporilor ei și log K_{ow} măsurat sau calculat în sediment, precum și stabilitatea ei în apă și în sediment. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței chimice testate în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție să fie cunoscute și raportate. Informații utile

▼M6

includ formula structurală și puritatea substanței chimice testate. De asemenea, este util să se cunoască soarta chimică a substanței chimice testate (de exemplu, disiparea, degradarea abiotică și biotică etc.). Orientări suplimentare privind testarea substanțelor chimice cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în referința (16).

SUBSTANȚE CHIMICE DE REFERINȚĂ

9. Substanțele chimice de referință pot fi testate periodic pentru a se asigura că sensibilitatea populației de laborator nu s-a schimbat. La fel ca în cazul dafniilor, ar fi suficientă efectuarea unui test al toxicității acute de 48 de ore (conform 17). Cu toate acestea, în așteptarea unei orientări valabile privind toxicitatea acută, conform capitolului C.28 din prezenta anexă poate fi luat în considerare un test al toxicității cronice. Exemple de substanțe toxice de referință utilizate cu succes în teste interlaboratoare și studii de validare sunt: lindan, trifluralin, pentaclorfenol, clorura de cadmiu și clorură de potasiu. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITATEA TESTULUI

10. Pentru ca testul să fie valid, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— eclozarea medie în tratamentul de control trebuie să fie de cel puțin 70 % la sfârșitul perioadei de expunere pentru ambele generații (1) (7);

— pentru *C. riparius* și pentru *C. yoshimatsui* 85 % din totalul chironomidelor adulte eclozate din vasul de tratament de control pentru ambele generații trebuie să aibă loc într-un interval de 12 – 23 de zile de la introducerea în vase a larvelor din primul stadiu larvar; pentru *C. dilutus*,, este acceptabilă o perioadă cuprinsă între 20 și 65 zile;

— Raportul mediu al sexelor exemplarelor adulte complet eclozate și vii (ca fracție de femelă sau mascul) în tratamentul de control pentru ambele generații trebuie să fie de cel puțin 0,4, dar nu mai mare de 0,6;

— pentru fiecare cușcă de reproducere numărul de șiraguri de ouă din vasele de control ale primei generații trebuie să fie de cel puțin 0,6 per femelă adăugată în cușca de reproducere;

— proporția de șiraguri de ouă fertile din fiecare cușcă de reproducere ale controalelor primei generații trebuie să fie de cel puțin 0,6;

— la sfârșitul perioadei de expunere pentru ambele generații, pH-ul și concentrația oxigenului dizolvat se măsoară în fiecare vas. Concentrația oxigenului trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (*air saturation value* – ASV ([1])), iar pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9 în toate vasele de testare;

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1 °C.

DESCRIEREA METODEI

Vasele de testare și cuștile de reproducere

11. Larvele sunt expus în pahare de laborator de sticlă de 600 ml măsurând circa 8,5 cm în diametru (a se vedea apendicele 5). Se pot folosi și alte vase, dar ele trebuie să asigure o adâncime corespunzătoare pentru sediment și apa acoperitoare. Suprafața sedimentului trebuie să fie suficient de mare pentru a permite un spațiu de 2 până la 3 cm^2 pentru fiecare larvă. Raportul dintre adâncimea stratului de sediment și

([1]) La 20 °C la presiune atmosferică standard, valoarea ASV din apa dulce este egală cu 9,1 mg/l (60 % este egal cu 5,46 mg/l)

▼M6

adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie de circa 1:4. Trebuie utilizate cuști de reproducere (minimum 30 cm în toate cele trei dimensiuni) prevăzute o plasă (dimensiunea ochiului de circa 1 mm) minimum la partea superioară și pe o parte a cuștii (a se vedea apendicele 5). În fiecare cușcă, se introduce un vas de cristalizare de 2 l, care conține apă și sediment de testare, pentru depunerea ouălor. De asemenea, pentru vasul de cristalizare, raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei acoperitoare trebuie să fie de aproximativ 1:4. După ce șiragurile de ouă sunt colectate din vasul de cristalizare, ele sunt plasate într-o placă de microtitrare cu 12 godeuri (un șirag per godeu conținând cel puțin 2,5 ml apă din vasul de cristalizare adițional), ulterior plăcile fiind acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Pot fi utilizate și alte vase adecvate pentru păstrarea șiragurilor de ouă. Cu excepția plăcilor de microtitrare, se recomandă ca toate vasele de testare și alte aparate care vor intra în contact cu sistemul de testare să fie complet din sticlă sau dintr-un alt material inert din punct de vedere chimic (de exemplu, politetrafluoretilenă).

Alegerea speciei

12. De preferință, specia care se utilizează în test este *Chironomus riparius*. Se mai poate utiliza și *C. yoshimatsui*. Este potrivită și specia *C. dilutus*, dar este mai greu de manipulat și necesită o durată mai mare de testare. Detalii privind metodele de cultură a *C. riparius* sunt prezentate în apendicele 2. De asemenea, sunt disponibile informații privind condițiile de cultură pentru *C. dilutus* (5) și pentru *C. yoshimatsui* (14). Identificarea speciei trebuie să fie confirmată înainte de testare, dar nu este necesară înainte de fiecare test în parte atunci când organismele provin dintr-o cultură proprie.

Sediment

13. De preferință, trebuie să se utilizeze sediment formulat (numit și sediment reconstituit, artificial sau sintetic). Totuși, în cazul în care se folosește sediment natural, caracteristicile acestuia trebuie să fie cunoscute (cel puțin pH-ul, conținutul de carbon organic, dar se recomandă și determinarea altor parametri ca raportul C/N și granulometria) și trebuie să nu existe niciun fel de contaminare și nici alte organisme care ar putea concura cu larvele de chironomide sau pe care le-ar putea consuma. De asemenea, înaintea testării se recomandă ca sedimentele să fie condiționate timp de șapte zile în condiții de testare. Se recomandă (1) (20) (21) următorul sediment formulat, astfel cum este descris în (1):

a. 4 – 5 % (greutate uscată) turbă: cu pH cât mai apropiat de valoarea 5,5 – 6; este important să se utilizeze turbă sub formă de pudră (dimensiunea particulelor ≤ 1 mm) și doar aer uscat;

b. 20 % (greutate uscată) argilă caolinică (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);

c. 75 – 76 % (greutate uscată) nisip de cuarț (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % dintre particule între 50 și 200 μm);

d. Se adaugă apă deionizată pentru a obține un conținut de umiditate al amestecului final în intervalul 30 – 50 %;

e. Se adaugă carbonat de calciu de calitate chimică pură ($CaCO_3$), pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la 7 ± 0,5;

f. Conținutul de carbon organic din amestecul final trebuie să fie 2 % (± 0,5 %) și se ajustează prin utilizarea unor cantități corespunzătoare de turbă și nisip, conform (a) și (c).

14. Trebuie să se cunoască sursa de turbă, argilă caolinică și nisip. Componentele sedimentului trebuie să fie verificate, pentru a confirma absența

▼M6

contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organoclorurați, compuși organofosforici). În apendicele 3 este descris un exemplu de preparare a sedimentului formulat. Se acceptă și amestecul de constituenți uscați dacă se demonstrează că după adăugarea apei acoperitoare nu apare o separare a constituenților sedimentului (de exemplu, plutirea unor particule de turbă) și că turba sau sedimentul sunt suficient condiționate.

Apă

15. Orice apă care corespunde caracteristicilor chimice ale unei ape de diluție acceptabile, astfel cum este prezentată în apendicele 2 și 4, este potrivită ca apă pentru testare. Orice apă adecvată, apă naturală (apă de suprafață sau apă subterană), apă reconstituită (a se vedea apendicele 2) sau apă de la robinet declorurată sunt acceptabile ca apă de cultură și apă de testare dacă chironomidele vor supraviețui în ea pe durata culturii și testării fără să prezinte semne de stres. La începutul testului, pH-ul apei de testare trebuie să fie între 6 și 9, iar duritatea totală să nu fie mai mare de 400 mg/l $CaCO_3$. Totuși, în cazul în care se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța chimică testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai mică (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediul Elendt M4). Același tip de apă trebuie să se utilizeze pe toată durata studiului. Caracteristicile calității apei prezentate în apendicele 4 trebuie să fie măsurate cel puțin de două ori pe an sau ori de câte ori se presupune că este posibil ca aceste caracteristici să se fi schimbat semnificativ.

Soluții stoc – Apă adiționată

16. a. Concentrațiile de testare se calculează pe baza concentrațiilor din coloana de apă, adică apa care acoperă sedimentul. Soluțiile de testare în concentrațiile alese se prepară de obicei prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin dizolvarea substanței chimice testate în apa de testare. În unele cazuri poate fi necesară folosirea solvenților sau a agenților de dispersie pentru a realiza o soluție stoc cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți adecvați sunt acetona, eterul monoetilic al etilen glicolului, eterul dimetilic al etilen glicolului, dimetilformamida și trietilen glicolul. Agenții de dispersie care pot fi utilizați sunt Cremophor RH40, Tween 80, metilceluloză 0,01 % și HCO-40. Concentrația agentului de solubilizare în mediul de testare final trebuie să fie minimă (i.e. $\leq$ 0,1 ml/l) și trebuie să fie aceeași pentru toate tratamentele. În cazul utilizării unui agent de solubilizare, acesta nu trebuie să aibă niciun efect semnificativ asupra supraviețuirii, astfel cum a fost demonstrat cu ajutorul unui control cu solvent în comparație cu un control negativ (apă). Totuși, se vor luat toate măsurile necesare pentru evitarea utilizării unor astfel de materiale.

Soluții stoc – Sediment adiționat

16. b. De obicei, sedimentele adiționate la o concentrație aleasă sunt preparate prin adăugarea unei soluții de substanță chimică testată direct în sediment. O soluție stoc de substanță testată dizolvată în apa deionizată este amestecată cu sedimentul formulat cu ajutorul unui tambur, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. Dacă este puțin solubilă în apă, substanța chimică testată se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform). Această soluție este apoi amestecată cu 10 g de nisip de cuarț fin pentru fiecare vas de testare. Se așteaptă evaporarea solventului și trebuie eliminat în totalitate din nisip; apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței chimice testate se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. Este necesar să se țină cont de faptul că nisipul provenit din amestecul de substanță chimică testată și nisip trebuie să fie luat în

▼M6

considerare atunci când se prepară sedimentul (adică sedimentul trebuie să fie astfel preparat cu mai puțin nisip). Trebuie să se asigure că substanța chimică testată adăugată la sediment este distribuită completă și uniform în sediment. Dacă este necesar, se pot analiza subeșantioane pentru determinarea gradului de omogenitate.

PROTOCOLUL TESTULUI

17. Protocolul testului se referă la alegerea numărului și la spațierea concentrațiilor de testare, la numărul de vase pentru fiecare concentrație și la numărul de larve per vas, la numărul de vase de cristalizare și de cuști de creștere. Protocolul pentru EC_x, NOEC și pentru un test limită sunt descrise mai jos.

Protocolul pentru analiza prin regresie

18. Concentrația pentru care se observă efecte (EC_x,) și intervalul de concentrații la care efectul substanței chimice testate este de interes trebuie să fie cuprinse în test, astfel încât parametrul studiat să nu fie extrapolat în afara limitelor datelor generate. Extrapolarea mult sub cea mai mică sau peste cea mai mare concentrație trebuie evitată. Pentru selectarea unui interval adecvat de concentrații de testare poate fi utilă realizarea unui test preliminar de determinare a intervalelor în conformitate cu metodele de testare C.27 sau C.28.

19. Pentru o metodă implicând EC_x, sunt necesare cel puțin cinci concentrații și opt replici pentru fiecare concentrație. Pentru fiecare concentrație trebuie utilizate două cuști de reproducere (A și B). Cele opt replici sunt împărțite în două grupe a câte patru replici pentru a deservi fiecare cușcă de reproducere. Această reunire a replicilor este necesară datorită numărului de chironomide necesare în cușcă în vederea unor evaluări corecte ale reproducerii. Cu toate acestea, cea de a 2-a generație numără din nou opt replici, inițiate din populațiile expuse în cuștile de reproducere. Factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi (cu o posibilă excepție în cazurile în care curba de doză-răspuns are o pantă ușoară). Numărul de replici pentru fiecare tratament poate fi redus la șase (trei pentru fiecare cușcă de reproducere) în cazul în care se crește numărul de concentrații de testare cu răspunsuri diferite. Creșterea numărului de replici sau reducerea mărimii intervalelor concentrațiilor de testare tinde să micșoreze intervalele de încredere în jurul EC_X.

Protocolul pentru estimarea NOEC

20. Pentru o metodă privind NOEC, trebuie utilizate cel puțin cinci concentrații de testare și cel puțin opt replici (4 pentru fiecare cușcă de reproducere, A și B), iar factorul dintre concentrații nu trebuie să fie mai mare de doi. Numărul de replici trebuie să fie suficient pentru a asigura o putere statistică adecvată pentru detectarea unei diferențe de 20 % față de control la un nivel de semnificație statistică de 5 % ($\alpha = 0{,}05$). Pentru rata de dezvoltare, fecunditate și fertilitate, este în general utilă o analiză a variației (ANOVA), urmată de testul Dunnett sau testul Williams (22 – 25). În ceea ce privește raportul de eclozare și raportul sexelor, pot fi utile testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (cu corecție Bonferroni) sau testul Mantel-Haentzal.

Test limită

21. Un test limită [o concentrație de testare și control (controale)] poate fi efectuat în cazul în care nu există efecte observate în testul preliminar opțional de determinare a intervalelor până la concentrația maximă. Scopul testului limită este de a indica faptul că orice efecte toxice ale substanței chimice testate se constată la niveluri superioare concentrației-limită testate. Pentru apă, sunt recomandate concentrații de 100 mg/l, iar pentru sediment de 1 000 mg/kg (greutate uscată). De obicei, sunt necesare cel puțin opt replici, atât pentru tratament, cât și pentru control. Trebuie să se demonstreze o putere statistică adecvată pentru

▼M6

detectarea unei diferențe de 20 % față de control la un nivel de semnificație statistică de 5 % (α = 0,05). Cu răspunsuri metrice (rată de dezvoltare), testul t este o metodă statistică adecvată atunci când datele îndeplinesc cerințele acestui test (normalitate, varianțe omogene). În cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite, se poate utiliza testul t pentru varianțe inegale sau un test neparametric, precum testul Wilcoxon-Mann-Whithey. Pentru raportul de eclozare este adecvat testul exact al lui Fisher.

PROCEDURA

Condiții de expunere

Pregătirea sistemului apă-sediment (adiționarea apei)

22. a. Sediment formulat (a se vedea punctele 13 – 14 și apendicele 3) este introdus în fiecare vas de testare și de cristalizare pentru a forma un strat de minimum 1,5 cm (pentru vasul de cristalizare acesta poate fi relativ mai subțire), dar de maximum 3 cm. Apa (a se vedea punctul 15) este introdusă astfel încât raportul dintre adâncimea stratului de sediment și adâncimea apei să nu depășească 1:4. După pregătirea vaselor de testare, sistemul sediment-apă trebuie lăsat la aerare ușoară timp de aproximativ șapte zile înainte de introducerea larvelor în primul stadiu din prima și din cea de a 2-a generație (a se vedea punctul 14 și apendicele 3). Sistemul sediment-apă al vaselor de cristalizare nu este aerat pe durata testării, deoarece nu este necesară asigurarea supraviețuirii larvelor (înainte de eclozare șiragurile de ouă sunt deja colectate). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și resuspendarea materiilor fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa. Discul este înlăturat imediat după aceea. Se pot utiliza și alte dispozitive.

Pregătirea sistemului apă-sediment (sediment adiționat)

22. b. Sedimentele adiționate pregătite conform punctului 16b sunt introduse în vase și în vasul de cristalizare, iar apa acoperitoare este adăugată pentru a se obține un raport volumic sediment-apă de 1:4. Adâncimea stratului de sediment trebuie să fie cuprinsă între 1,5 și 3 cm (aceasta poate fi relativ mai mică pentru vasul de cristalizare). Pentru a evita separarea ingredientelor sedimentului și resuspendarea materiilor fine în timpul adăugării apei de testare în coloana de apă, sedimentul poate fi acoperit cu un disc din plastic în timp ce se toarnă apa, apoi discul este înlăturat imediat. Se pot utiliza și alte dispozitive. După adăugarea de apă acoperitoare peste sedimentul adiționat, este de dorit să se lase timp pentru migrarea substanței chimice testate din sediment în faza apoasă (4) (5) (7) (18). De preferință, aceasta trebuie să se realizeze în condițiile de temperatură și aerare utilizate în test. Perioada de timp corespunzătoare pentru echilibrare depinde de sediment și de substanța chimică și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge până la cinci săptămâni. Întrucât în această perioadă s-ar putea produce degradarea multor substanțe chimice, nu se așteaptă atingerea echilibrului, dar se recomandă o perioadă de echilibrare de 48 de ore. Cu toate acestea, atunci când timpul de înjumătățire a degradării substanței chimice în sediment este cunoscut ca fiind lung (a se vedea punctul 8), perioada de echilibrare poate fi prelungită. La sfârșitul acestei perioade de echilibrare suplimentare, concentrația substanței chimice testate trebuie să fie măsurată în apa acoperitoare, în apa interstițială și în sediment, cel puțin la concentrația cea mai mare și la una mai mică (a se vedea punctul 38). Aceste determinări analitice ale substanței chimice testate permit calculul bilanțului masic și exprimarea rezultatelor pe baza concentrațiilor măsurate.

23. Vasele de testare trebuie să fie acoperite (de exemplu, cu plăci din sticlă). Dacă este necesar, în timpul studiului nivelul apei se completează până la volumul original, pentru a compensa evaporarea. Această operațiune trebuie să se efectueze cu apă distilată sau apă deionizată, pentru a preveni acumularea de săruri. Vasele de cristalizare din cuștile de reproducere nu sunt acoperite și este posibil, însă nu indispensabil, să fie

▼M6

ajustate pentru a compensa pierderea de apă pe durata perioadei de testare, întrucât șiragurile de ouă sunt în contact cu apa numai timp de aproximativ o zi, iar vasele sunt utilizate numai într-o scurtă fază a testului.

Adăugarea de organisme de testare

24. Cu patru sau cinci zile înainte de a introduce larve în primul stadiu pentru prima generație, masele de ouă trebuie prelevate din cultură și plasate în vase mici conținând mediul de cultură. Se poate utiliza un mediu de cultură învechit provenit din cultura stoc sau un mediu proaspăt preparat. În orice caz, în mediul de cultură se va adăuga o mică cantitate de hrană, de exemplu câteva picături dintr-o suspensie de hrană fin măcinată pentru pești sub formă de fulgi (a se vedea apendicele 2). Trebuie să se utilizeze doar mase de ouă proaspăt depuse. În mod normal, larvele încep să eclozeze după aproximativ 2 zile de la depunerea ouălor (2 – 3 zile pentru *C. riparius* la 20 °C și 1 – 4 zile pentru *C. dilutus* la 23 °C și *C. yoshimatsui* la 25 °C), iar creșterea larvelor se realizează în patru stadii, fiecare cu o durată de 4 – 8 zile. În test trebuie utilizate larve în primul stadiu (maximum 48 de ore după eclozare). Este posibilă verificarea stadiului de dezvoltare a larvelor în funcție de lățimea capsulei cefalice (7).

25. Douăzeci de larve din primul stadiu de dezvoltare pentru prima generație sunt alocate în mod aleatoriu fiecărui vas de testare care conține sistemul de sediment-apă, cu ajutorul unei pipete neefilate. Aerarea apei este oprită în timpul introducerii larvelor în vasele de testare și trebuie să rămână astfel timp de 24 de ore după introducerea acestora (a se vedea punctul 32). În funcție de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve folosite pentru fiecare concentrație este de cel puțin 120 (6 replici per concentrație) pentru metoda EC_X și de cel puțin 160 pentru metoda NOEC (8 replici per concentrație). În cazul protocolului cu sediment adiționat, expunerea începe o dată cu introducerea larvelor.

Adiționarea apei acoperitoare

26. La douăzeci și patru de ore după adăugarea de larve în primul stadiul larvar pentru prima generație, substanța chimică testată este adiționată în coloana de apă acoperitoare, fiind asigurată din nou o ușoară aerare (pentru posibile modificări ale protocolului de testare, a se vedea punctul 7). Cu ajutorul unei pipete se aplică mici volume de soluții stoc de substanță chimică testată sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. În cadrul protocolului cu apă adiționată, expunerea începe cu adiționarea apei (la o zi de la introducerea larvelor).

Colectarea adulților eclozați

27. Chironomidele eclozate din prima generație sunt colectate cel puțin o dată, însă, de preferință, de două ori pe zi (a se vedea punctul 36) din vasele de testare cu ajutorul unui aspirator, exhaustor sau al unui dispozitiv similar (a se vedea apendicele 5). Trebuie să fie acordată o atenție deosebită pentru a nu provoca leziuni adulților. Chironomidele colectate din patru vase de testare aferente unui tratament sunt eliberate într-o cușcă de reproducere la care au fost repartizate în prealabil. În ziua primei eclozări (masculi), vasele de cristalizare sunt adiționate prin introducerea cu ajutorul unei pipete a unui volum mic de soluție stoc de substanță chimică testată sub suprafața apei (protocol cu apă adiționată). Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. Concentrația substanței chimice testate din vasul de cristalizare este în mod nominal aceeași ca în vasele de tratament care sunt alocate respectivei cuști de reproducere specifice. În cadrul protocolului cu sediment adiționat, vasele de cristalizare sunt preparate în aproximativ,

▼M6

ziua a 11-a de la începerea expunerii (introducerea de larve de primă generație), astfel încât să se poată realiza echilibrarea acestora timp de aproximativ 48 de ore înainte de producerea primelor șiraguri de ouă.

28. Șiragurile de ouă sunt colectate din vasul de cristalizare în cușca de reproducere cu ajutorul unor pensete sau al unei pipete neefilate. Fiecare șirag de ouă se introduce într-un vas care conține mediu de cultură din vasul de cristalizare din care a fost colectat (de exemplu, o microplacă cu 12 godeuri împreună cu cel puțin 2,5 ml de mediu). Vasele care conțin șiragurile de ouă sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Șiragurile de ouă sunt păstrate pentru observație timp de cel puțin șase zile după ce au fost produse, astfel încât să poată fi clasificate ca fertile sau infertile.

Pentru începerea celei de a 2-a generații, cel puțin trei, însă de preferință șase șiraguri de ouă fertile sunt selectate din fiecare cușcă de creștere și, cu puțină hrană, sunt lăsate să eclozeze. Aceste șiraguri de ouă trebuie să fi fost produse în momentul maxim al activității de depunere a ouălor, care în mod normal are loc în jurul celei de a 19-a zile de testare în controale. În mod ideal, a 2-a generație în toate grupurile de tratament apare în aceeași zi, însă din cauza efectelor substanței chimice asupra dezvoltării larvelor, se poate ca aceasta să nu fie posibilă întotdeauna. În acest caz, concentrațiile mai mari pot fi inițiate mai târziu decât tratamentele cu concentrații mai mici și controlul (solvent).

29. a. În cadrul protocolului cu apă adiționată, sistemul apă-sediment pentru cea de a 2-a generație este pregătit prin adiționarea substanței chimice testate în coloana de apă acoperitoare cu circa 1 oră înainte de introducerea larvelor în primul stadiu de dezvoltare în vasele de testare. Cu ajutorul unei pipete, se aplică mici volume de soluții stoc ale substanțelor chimice testate sub suprafața apei. Apoi, apa acoperitoare trebuie să fie amestecată cu grijă, pentru a nu perturba sedimentul. După adiționare, se asigură o ușoară aerare.

29. b. În protocolul cu sediment adiționat, vasele de expunere care conțin sistemul apă-sediment pentru cea de a 2-a generație sunt pregătite în același mod ca pentru prima generație.

30. Douăzeci de larve în primul stadiu de dezvoltare (maximum 48 de ori după eclozare) din cea de a 2-a generație sunt alocate în mod aleatoriu fiecărui vas de testare care conține sistemul sediment adiționat-apă, cu ajutorul unei pipete neefilate. Aerarea apei trebuie să fie oprită după introducerea de larve din primul stadiu de dezvoltare în vasele de testare și trebuie să fie menținută astfel timp de încă 24 de ore după introducerea larvelor. În funcție de protocolul de testare utilizat (a se vedea punctele 19 și 20), numărul de larve folosite pentru fiecare concentrație este de cel puțin 120 (6 replici per concentrație) pentru metoda EC_X și de cel puțin 160 pentru metoda NOEC (8 replici per concentrație).

Hrană

31. Larvele din vasele de testare trebuie să fie hrănite de preferință zilnic sau de cel puțin trei ori pe săptămână. Hrană pentru pești (o suspensie în apă sau hrană fin măcinată, de exemplu Tetra-Min sau Tetra-Phyll; a se vedea detalii în apendicele 2) între 0,25 și 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pentru *C. yoshimatsui*) per larvă per zi reprezintă o cantitate adecvată de hrană pentru larvele tinere în primele 10 zile a dezvoltării lor. Este posibil să fie necesară mai multă hrană pentru larvele cu vârstă mai mare: 0,5 – 1 mg per larvă per zi ar trebui să fie suficient pentru restul testului. Porția de hrană trebuie să fie redusă pentru toate grupurile tratate sau de control dacă se constată dezvoltarea de ciuperci sau dacă sunt observate cazuri de deces la controale. În cazul în care dezvoltarea de ciuperci nu poate fi oprită, testul trebuie repetat.

Relevanța toxicologică a expunerii prin ingestie este în general mai mare în cazul substanțelor chimice cu o puternică afinitate pentru carbonul

▼M6

organic sau al substanţelor chimice cu legături covalente cu sedimentul. Prin urmare, în cazul testării substanţelor chimice care au astfel de proprietăţi, cantitatea de hrană necesară pentru a asigura supravieţuirea şi creşterea naturală a larvelor poate fi adăugată în sedimentul formulat înainte de perioada de stabilizare, în funcţie de cerinţa de reglementare. Pentru a preveni deteriorarea calităţii apei, trebuie folosite plante în loc de hrană pentru peşti, de exemplu adăugarea a 0,5 % (greutate uscată) de frunze fin măcinate de urzică (*Urtica dioica*), de dude (*Morus alba*), de trifoi alb (*Trifolium repens*), de spanac (*Spinacia oleracea*) sau de la alte plante (*Cerophyl* sau α-celuloză). Adăugarea în sediment a întregii porţii de hrană de origine organică înainte de adiţionare nu este lipsită de consecinţe în ceea ce priveşte calitatea apei şi performanţele biologice (21) şi nici nu reprezintă o metodă standardizată, însă studii recente indică că această metodă dă rezultate (19) (26). Chironomidele adulte din cuştile de reproducere nu au în mod normal nevoie de hrană, însă fecunditatea şi fertilitatea sunt îmbunătăţite atunci când adulţilor eclozaţi li se pune la dispoziţie ca sursă de hrană un tampon de vată îmbibat cu o soluţie saturată de zaharoză (34).

Condiţii de incubare

32. Aerarea uşoară a apei acoperitoare în vasele de testare se efectuează cu 24 de ore după adăugarea larvelor din primul stadiul de dezvoltare din ambele generaţii şi este continuată pe tot parcursul testului (trebuie să se acorde atenţie concentraţiei de oxigen dizolvat, care nu trebuie să scadă sub nivelul de 60 % din ASV). Aerarea se face cu ajutorul unei pipete Pasteur din sticlă a cărei orificiu este fixat la 2 – 3 cm deasupra stratului de sediment eliberând câteva bule pe secundă. La testarea substanţelor chimice volatile, trebuie să se acorde atenţie ca sistemul sediment-apă să nu fie aerat, asigurând în acelaşi timp respectarea criteriului de validitate de 60 % din ASV (punctul 10). Orientări suplimentare sunt disponibile la referinţa (16).

33. Testul pentru *C. riparius* se efectuează la o temperatură constantă de 20 °C (± 2 °C). Pentru *C. dilutus* şi *C. yoshimatsui*, temperaturile recomandate sunt 23 °C şi, respectiv, 25 °C (± 2 °C). Se utilizează o perioadă de expunere la lumină de 16 ore, iar intensitatea luminii trebuie să fie de 500 – 1 000 lux. Pentru cuştile de reproducere, poate fi inclusă o oră suplimentară de fază de zori şi de amurg.

Durata expunerii

34. Protocolul cu apă adiţionată: Perioada de expunere a primei generaţii începe atunci când substanţa chimică testat este adiţionată în apa acoperitoare a vaselor de testare (adică la o zi de la introducerea larvelor – pentru modificări posibile ale protocolului de expunere, a se vedea punctul 7). Expunerea larvelor din cea de a 2-a generaţie începe imediat, întrucât ele sunt introduse într-un sistem sediment-apă deja adiţionat. Durata maximă de expunere pentru 1-a generaţie este de 27 de zile, iar pentru a 2-a generaţie este de 28 de zile (larvele din 1-a generaţie petrec o zi în vasele fără expunere) pentru *C. riparius* şi *C. yoshimatsui*. Ţinând cont de suprapunere, durata totală a testării este de aproximativ 44 de zile. Pentru *C. dilutus*, duratele maxime de expunere sunt de 64 şi de 65 de zile pentru prima generaţie şi, respectiv, pentru cea de a 2-a generaţie. Durata totală este de aproximativ 100 de zile.

Protocolul cu sediment adiţionat: expunerea începe cu adăugarea de larve şi este de maximum 28 de zile pentru ambele generaţii pentru *C. riparius* şi *C. yoshimatsui* şi de maximum 65 de zile pentru ambele generaţii pentru *C. dilutus*.

Observaţii

Eclozare

35. Timpul de dezvoltare şi numărul total de chironomide, femele şi masculi, eclozate şi vii sunt determinate pentru ambele generaţii. Masculii sunt uşor de identificat prin antenele plumoase şi prin corpul lor fin.

▼M6

36. Vasele de testare pentru ambelor generații trebuie observate de cel puți trei ori pe săptămână pentru a vedea dacă larvele prezintă comportamente anormale (de exemplu, ieșirea din sediment, înot neobișnuit) în raport cu controlul. În perioada de eclozare, care începe după aproximativ 12 zile de la introducerea larvelor pentru *C. riparius* și *C. yoshimatsui* (după 20 de zile pentru *C. dilutus*), chironomidele eclozate sunt numărate și li se stabilește sexul cel puțin o dată, dar, de preferință, de două ori pe zi (dimineața devreme și după-amiaza târziu). După identificare, chironomidele din prima generație sunt îndepărtate cu grijă din vase și sunt transferate într-o cușcă de reproducere. Chironomidele din cea de a 2-a generație sunt îndepărtate și ucise după identificare. Orice șiraguri de ouă depozitate în vasele de testare ale primei generații trebuie să fie colectate individual și transferate cu cel puțin 2,5 ml de apă nativă în plăci de microtitrare cu 12 godeuri (sau în alte vase adecvate) care sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Numărul de larve moarte și pupe vizibile care nu au eclozat trebuie înregistrate. Exemple de cuști de reproducere, de vase de testare și de exhaustoare sunt furnizate în apendicele 5.

Reproducerea

37. Efectele asupra reproducerii sunt evaluate prin determinarea numărului de șiraguri de ouă produse de prima generație de chironomide și prin fertilitatea acestor șiraguri de ouă. O dată pe zi șiragurile de ouă sunt colectate din vasele de cristalizare plasate în fiecare recipient de reproducere. Șiragurile de ouă trebuie colectate și transferate cu cel puțin 2,5 ml de apă nativă într-un placă de microtitrare cu 12 godeuri (un șirag de ouă în fiecare godeu) sau în alte vase adecvate care sunt acoperite cu un capac pentru a preveni evaporarea semnificativă. Următoarele caracteristici sunt documentate pentru fiecare șirag de ouă: ziua de producție, dimensiuni (normale, adică 1 ± 0,3 cm sau mici; tipic ≤ 0,5 cm) și structura (normală = formă de banană cu șirag de ouă dispuse în spirală sau anormală, de exemplu, șirag de ouă nespiralat) și fertilitatea (fertile sau infertile). Pe parcursul unei perioade de șase zile după producere fertilitatea unui șirag de ouă este evaluată. Un șirag de ouă este considerat fertil atunci când cel puțin un ou din trei eclozează. Numărul total de femele introduse în cușca de reproducere este utilizat pentru a calcula numărul de șiraguri de ouă per femelă și numărul de șiraguri de ouă fertile per femelă. Dacă este necesar, numărul de ouă dintr-un șirag de ouă poate fi estimat în mod nedistructiv cu ajutorul metodei numărării inelelor (detaliată în referințele 32 și 33).

Măsurători analitice

Concentrația substanței chimice testate

38. Ca cerință minimă, eșantioanele din apa acoperitoare, din apa interstițială și din sediment trebuie analizate la începutul expunerii (în cazul adiționării apei, de preferință la o oră după aplicare) și la sfârșitul testului, la concentrația cea mai mare și la o concentrație mai mică. Aceasta se aplică vaselor din ambele generații. Din vasele de cristalizare în cuștile de reproducere numai apa acoperitoare este analizată, întrucât doar cu aceasta intră în contract șiragurile de ouă (în ceea ce privește protocolul cu sediment adiționat, poate fi avută în vedere o confirmare analitică a concentrației sedimentului). Dacă se consideră necesar, pe durata testului pot fi efectuate măsurători suplimentare ale sedimentului, ale apei interstițiale sau ale apei acoperitoare. Aceste determinări ale concentrației substanței chimice testate furnizează informații despre comportamentul/partiția substanței chimice testate în sistemul apă-sediment. Eșantionarea sedimentului și a apei interstițiale la începutul și pe durata testului (a se vedea punctul 39) necesită vase de testare suplimentare pentru realizarea de determinări analitice. Măsurătorile efectuate în sediment în cadrul protocolului cu apă adiționată pot să nu fie necesare dacă migrarea

▼M6

substanței chimice testate între apă și sediment a fost determinată în mod clar într-un studiu apă/sediment în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment/apă, tipul de aplicare, conținutul de carbon organic din sediment) sau dacă se arată că concentrațiile măsurate în apa acoperitoare au rămas la valori cuprinse între 80 și 120 % din valorile nominale sau măsurate inițial.

39. Atunci când se efectuează măsurători intermediare (de exemplu, în ziua a 7-a și/sau a 14-a) și dacă pentru analiză este nevoie de eșantioane mari care nu pot fi prelevate din vasele de testare fără a influența sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice pe eșantioane din vase de testare suplimentare tratate în același mod (inclusiv prezența organismelor de testare), dar neutilizate pentru observații biologice.

40. Procedura recomandată pentru izolarea apei interstițiale este centrifugarea, de exemplu la 10 000 g și 4 °C timp de 30 de minute. Totuși, în cazul în care se demonstrează că substanța chimică testată nu se adsoarbe pe filtre, se poate accepta și filtrarea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială, pentru că dimensiunea eșantionului este prea mică.

Parametri fizico-chimici

41. pH-ul. oxigenul dizolvat în apa de testare și temperatura apei din vasele de testare și din vasele de cristalizare trebuie măsurate în mod corespunzător (a se vedea punctul 10). Duritatea apei și amoniacul trebuie măsurate în vasele de control, precum și în unul dintre vasele de testare și de cristalizare la cea mai mare concentrație, la începutul și la sfârșitul testului.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

42. Scopul acestui test care cuprinde ciclul de viață este determinarea efectului substanței chimice testate asupra reproducerii și, pentru două generații, a ratei de dezvoltare și a numărul total al chironomidelor complet eclozate și vii, femele și masculi. Pentru a determinat rata de eclozare, trebuie agregate datele privind femelele și masculii. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între sensibilitățile ratelor de dezvoltare ale sexelor separate, rezultatele privind femelele și masculii pot fi agregate pentru analizare statistică.

43. Concentrațiile la care se observă efecte exprimate sub formă de concentrații în apa acoperitoare (pentru apa adiționată) sau în sediment (pentru sedimentul adiționat) sunt calculate de obicei pe baza concentrațiilor măsurate la începutul expunerii (a se vedea punctul 38). Prin urmare, pentru apa adiționată, concentrațiile măsurate în mod tipic la începutul expunerii în apa acoperitoare a vaselor pentru ambele generații și cele măsurate în vasele de cristalizare sunt transformate în medii pentru fiecare tratament. Pentru sedimentul adiționat, concentrațiile măsurate în mod tipic la începutul expunerii în vasele pentru ambele generații (și opțional cele măsurate în vasele de cristalizare) sunt transformate în medii pentru fiecare tratament.

44. Pentru a calcula o estimare punctuală, adică o EC_x, datele statistice per vas și per cușcă de reproducere pot fi utilizate ca replici veritabile. La calcularea intervalului de încredere pentru orice EC_x, trebuie să se țină seama de variabilitatea între vase sau trebuie să se demonstreze că această variabilitate este atât de mică încât poate fi ignorată. Atunci când modelul este ajustat cu metoda celor mai mici pătrate, trebuie să se aplice o transformare la datele statistice pentru fiecare vas, în vederea îmbunătățirii omogenității variației. Totuși, valorile EC_x trebuie să fie calculate după ce răspunsul este transformat înapoi la valoarea originală (31).

▼M6

45. Atunci când analiza statistică vizează determinarea NOEC prin testarea ipotezei, variabilitatea între vase trebuie să fie luată în considerare, ceea ce garantează utilizarea metodelor ANOVA (de exemplu, procedurile de testare Williams și Dunnett). Testul Williams este adecvat atunci când o relație doză-răspuns monotonă este preconizată în teorie, iar testul Dunnett este adecvat atunci când ipoteza monotonicității nu este preconizată. Alternativ, teste mai robuste (27) pot fi adecvate în situații în care există violări ale ipotezelor ANOVA obișnuite (31).

Rata de eclozare

46. Ratele de eclozare sunt date cantitative și pot fi analizate cu ajutorul testului Cochran-Armitage aplicat în mod descrescător atunci când se preconizează o relație doză-răspuns monotonă și când aceste date corespund preconizării. În caz contrar, se poate utiliza testul exact al lui Fisher sau testul Mantel-Haentzal, cu valori p ajustate Bonferroni-Holm. În cazul în care există dovezi că variabilitatea între replici este mai mare la aceeași concentrație decât ar indica o distribuție binomială (adesea numită variație „extra-binomială”), atunci trebuie să se utilizeze un test robust Cochran-Armitage sau testul exact al lui Fisher, așa cum se propune în referința (27).

Suma chironomidelor vii (masculi plus femele) eclozate per vas, n_e, este determinată și împărțită la numărul de larve introduse, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

unde:

ER = rata de eclozare

n_e = numărul de chironomide vii eclozate per vas

n_a = numărul de larve introduse per vas (în mod normal 20)

Atunci când n_e este mai mare decât n_a (adică atunci când a fost introdus în mod neintenționat un număr de larve mai mare decât numărul prevăzut) n_a trebuie să fie adus la egalitate cu n_e.

47. O abordare alternativă mai adecvată pentru eșantioane de dimensiuni mari, atunci când există o variantă extra-binominală, este tratarea ratei de eclozare ca răspuns continuu și utilizarea de proceduri coerente cu aceste date *ER*. O dimensiune mare a eșantionului este definită, în acest caz, ca fiind numărul de eclozări și numărul de neeclozări, ambele mai mari decât cinci, per replică (vas).

48. Pentru aplicarea metodelor ANOVA, valorile *ER* trebuie să fie mai întâi transformate prin transformarea *arcsin-sqrt* sau prin transformarea Freeman-Tukey, pentru a obține o distribuție aproximativ normală și pentru a egaliza variațele. Testul Cochran-Armitage, testul exact al lui Fisher (Bonferroni) sau testul Mantel-Haentzal pot fi aplicate atunci când se utilizează frecvențe absolute. Transformarea *arcsin-sqrt* este aplicată prin preluarea inversul sinusului (sinus^{-1}) al rădăcinii pătrate a *ER*.

49. Pentru ratele de eclozare, valorile EC_x sunt calculate cu ajutorul analizei de regresie [de exemplu, *probit*, *logit* sau modelele Weibull (28)]. În cazul în care analiza de regresie eșuează (de exemplu, atunci când există mai puțin de două răspunsuri parțiale), se utilizează alte metode neparametrice, precum media mobilă sau interpolarea simplă.

Rata de dezvoltare

50. Durata medie de dezvoltare reprezintă intervalul de timp mediu dintre introducerea larvelor (ziua 0 a testului) și eclozarea cohortelor experimentale de chironomide (pentru calcularea duratei de dezvoltare reale,

▼M6

trebuie luată în considerare vârsta larvelor în momentul introducerii). Rata de dezvoltare (unitate: 1/zi) este inversul duratei de dezvoltare și reprezintă acea parte din dezvoltarea larvară care are loc în cursul unei zile. Rata de dezvoltare este preferată pentru evaluarea acestor studii de toxicitate cu sedimente, pentru că varianța sa este mai mică și este mai omogenă și mai apropiată de distribuția normală, comparativ cu durata de dezvoltare. Prin urmare, cu rata de dezvoltare se pot utiliza proceduri de testare parametrică mai puternice, spre deosebire de durata de dezvoltare. Pentru rata de dezvoltare ca răspuns continuu, valorile EC_x pot fi estimate prin utilizarea analizei de regresie [de exemplu, (29), (30)]. O NOEC pentru rata de dezvoltare medie poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett. Întrucât eclozarea masculilor are loc mai devreme decât cea a femelelor, adică au o rată de dezvoltare mai ridicată, are sens ca rata de dezvoltare să fie calculată separat pentru fiecare sex, în plus față de cea pentru toate chironomidele.

51. Pentru testele statistice, se presupune că numărul de chironomide observate în ziua de inspecție x au eclozat la media intervalului de timp dintre ziua x – l (l = lungimea intervalului de inspecție, de obicei 1 zi). Rata medie de dezvoltare per vas ($\overline{x}$) este calculată cu formula:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

unde:

$\overline{x}$: rata medie de dezvoltare per vas

i: indicele intervalului de inspecție

m: numărul maxim de intervale de inspecție

f_i: numărul de chironomide eclozate în intervalul de inspecție i

n_e: numărul total de chironomide eclozate la sfârșitul experimentului (Σf_i)

x_i: rata de dezvoltare a chironomidelor eclozate în intervalul i

$$x_i = 1/\text{ziua}_i - \frac{l_i}{2}$$

unde:

ziua_i: ziua de inspecție (numărul de zile de la introducerea larvelor)

l_i: lungimea intervalului de inspecție i (zile, de obicei 1 zi)

Raportul sexelor

52. Datele privind raportul sexelor sunt date cantitative și, prin urmare, trebuie evaluate cu ajutorul testului exact al lui Fisher sau al altor metode adecvate. Raportul natural al sexelor pentru *C. riparius* este unu, adică masculii și femelele sunt în număr egal. Pentru ambele generații, datele privind raportul sexelor trebuie tratate în mod identic. Întrucât numărul maxim de chironomide per vas (20) este prea mic pentru o analiză statistică semnificativă, se va aduna numărul total de chironomide

▼M6

complet eclozate și vii pentru fiecare sex din toate vasele corespunzătoare unui singur tratament. Aceste date brute sunt comparate cu controlul (solvent) sau cu datele agregate referitoare la control într-un tabel de contingență 2 × 2.

Reproducerea

53. Reproducerea, la fel ca fecunditatea, se calculează ca numărul de șiraguri de ouă per femelă. Mai specific, numărul total de șiraguri de ouă produs într-o cușcă de reproducere este împărțit la numărul total de femele vii și fără leziuni introduse în cușca respectivă. NOEC pentru fecunditate poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett.

54. Fertilitatea șiragurilor de ouă este utilizată pentru cuantificarea numărului de șiraguri de ouă fertile per femelă. Numărul total de șiraguri de ouă fertile produs într-o cușcă de reproducere este împărțit la numărul total de femele vii și fără leziuni, introduse în cușca respectivă. NOEC pentru fertilitate poate fi determinată prin metode ANOVA, de exemplu testul Williams sau testul Dunnett.

Raportul privind testul

55. Raportul privind testul trebuie să furnizeze următoarele informații:

Substanța chimică testată:

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice [solubilitatea în apă, presiunea vaporilor, coeficientul de partiție log K_{ow} în sol (sau în sediment, dacă este disponibil), stabilitatea în apă etc.];

— datele de identificare chimică (denumirea comună, denumirea chimică, formula structurală, numărul CAS etc.), inclusiv puritatea și metoda analitică de cuantificare a substanței chimie testate.

Speciile folosite pentru testare:

— organisme de testare utilizate: specie, denumirea științifică, sursa organismelor și condițiile de creștere;

— informații privind modul în care au fost manipulate masele de ouă și larvele;

— informații privind manipularea adulților eclozați din prima generație cu ajutorul unui exhaustor (a se vedea apendicele 5);

— vârsta organismelor de testare în momentul introducerii lor în vasele de testare pentru prima și cea de a 2-a generație.

Condiții de testare:

— sedimentul folosit, adică sediment natural sau formulat (artificial);

— sediment natural: locația de prelevare și descrierea ei, incluzând, dacă este posibil, istoricul contaminării; caracteristicile sedimentului: pH, conținutul de carbon organic, raportul C/N și granulometria (dacă este cazul).

— sediment formulat: pregătirea, ingredientele și caracteristicile (conținutul de carbon organic, pH-ul, umiditatea etc. măsurate la începutul testului);

— pregătirea apei de testare (dacă se folosește apă reconstituită) și caracteristici (concentrație de oxigen, pH, duritate etc. măsurate la începutul testului);

▼**M6**

— adâncimea sedimentului și a apei acoperitoare pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;

— volumul apei acoperitoare și al apei interstițiale; greutatea sedimentului umed cu și fără apă interstițială pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;

— vasele de testare (material și dimensiune);

— vasele de cristalizare (material și dimensiune);

— cuști de reproducere (material și dimensiune);

— metoda de preparare a soluțiilor stoc și a concentrațiilor de testare pentru vasele de testare și pentru vasele de cristalizare;

— aplicarea substanței chimice testate în vasele de testare și în vasele de cristalizare: concentrațiile de testare, numărul de replici și solvenții, dacă este necesar;

— condițiile de incubare pentru vasele de testare: temperatură, ciclul și intensitatea luminii, aerare (numărul de bule pe secundă);

— condițiile de incubare pentru cuștile de reproducere și pentru vasele de cristalizare: temperatură, ciclul și intensitatea luminii;

— condițiile de incubare pentru șiragurile de ouă din microplăci (sau din alte vase): temperatură, ciclul și intensitatea luminii:

— informații detaliate privind hrănirea, inclusiv tipul de hrană, prepararea, cantitatea și regimul de hrănire.

Rezultate:

— valorile nominale ale concentrațiilor de testare, valorile măsurate ale concentrațiilor de testare și rezultatele tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței chimice testate în vasele de testare și în vasele de cristalizare;

— calitatea apei din vasele de testare și din vasele de cristalizare, și anume, pH-ul, temperatura, oxigenul dizolvat, duritatea și amoniacul;

— înlocuirea apei de testare evaporate pentru vasele de testare, dacă este cazul;

— numărul de chironomide, masculi și femele, eclozate per vas și pe zi pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;

— raportul sexelor chironomidelor complet eclozate și vii per tratament pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;

— numărul larvelor neeclozate ca chironomide per vas pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;

— procentul/fracție de eclozare per replică și concentrația de testare (chironomide masculi și femele agregate) pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;

— rata de dezvoltare medie a chironomidelor complet eclozate și vii per replică și rata de tratament (chironomide masculi și femele separate și agregate) pentru prima și pentru cea de a 2-a generație;

— numărul de șiraguri de ouă depozitate în vasele de cristalizare per cușcă de reproducere și per zi;

▼**M6**

— caracteristicile fiecărui șirag de ouă (dimensiune, formă și fertilitate);

— fecunditatea – numărul total de șiraguri de ouă per număr total de femele introduse în cușca de reproducere;

— fertilitatea – numărul total de șiraguri de ouă per număr total de femele introduse în cușca de reproducere;

— estimate ale parametrilor studiați care semnifică toxicitate, de exemplu EC_x (și intervalele de încredere asociate), NOEC și metodele statistice utilizate pentru determinarea lor;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra semnificației testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

BIBLIOGRAFIE

(1) Chapter C.28 of this Annex, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311-322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47-57.

(15) Chapter C.27 of this Annex, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298-312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1-9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Apendicele 1

Definiții

În cadrul acestei metode de testare se folosesc următoarele definiții:

Substanța chimică este o substanță sau un amestec.

Sedimentul formulat sau reconstituit, artificial sau sintetic, este un amestec de materiale utilizat pentru a simula componentele fizice ale sedimentului natural.

Apa acoperitoare este apa plasată peste sediment în vasul de testare.

Apa interstițială este apa care ocupă spațiul dintre sediment și particulele de sol.

Apa adiționată este apa de testare la care s-a adăugat substanța chimică testată.

Substanța chimică testată este orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

▼M6

Apendicele 2

Recomandări pentru cultivarea *Chironomus riparius*

1. Larvele de *Chironomus* pot fi crescute în vase de cristalizare sau în recipiente mai mari. Pe fundul unui recipient se împrăștie nisip fin de cuarț într-un strat subțire, de circa 5 – 10 mm grosime. Un substrat adecvat (este suficient un strat mai subțire, de maximum câțiva mm) s-a dovedit a fi și Kieselgur (de exemplu Merck, articolul 8117). Apoi se adaugă apă adecvată până se atinge o înălțime de câțiva cm. Nivelurile apei trebuie să fie completate în funcție de necesități pentru a înlocui apa evaporată și a preveni uscarea. Apa poate fi înlocuită, dacă este necesar. Trebuie să se asigure o aerare ușoară. Vasele în care sunt crescute larvele trebuie să fie păstrate într-o cușcă adecvată, pentru a nu permite ca adulții eclozați să scape. Cușca trebuie să fie suficient de mare pentru a permite formarea roiurilor de adulți eclozați, altfel este posibil să nu apară copulația (dimensiunea minimă este de circa 30 × 30 × 30 cm).

2. Cuștile trebuie să fie păstrate la temperatura camerei sau într-o încăpere cu mediu constant, la 20 ± 2 °C, cu o perioadă de expunere la lumină de 16 ore (intensitate de circa 1 000 lux), cu 8 ore de întuneric. S-a raportat că o umiditate a aerului mai mică de 60 % umiditate relativă poate împiedica reproducerea.

Apa de diluție

3. Se poate utiliza orice apă naturală sau sintetică adecvată. În mod obișnuit se folosește apă de fântână, apă de la robinet declorurată și medii artificiale (de exemplu, mediu Elendt „M4” sau „M7”, a se vedea mai jos). Apa trebuie să fie aerată înainte de utilizare. Dacă este nevoie, apa de cultură poate fi reînnoită prin turnarea sau sifonarea cu atenție a apei uzate din vasele de cultură, fără să se distrugă eprubetele cu larve.

Hrănirea larvelor

4. Larvele de *Chironomus* trebuie să fie hrănite cu hrană pentru pești sub formă de fulgi (TetraMin®, TetraPhyll® sau altă marcă similară de hrană pentru pești), în cantitate de aproximativ 250 mg pe zi pentru fiecare vas. Hrana poate fi furnizată sub formă de pulbere măcinată uscată sau sub formă de suspensie în apă: se adaugă 1 g de hrană sub formă de fulgi în 20 ml de apă de diluție și se amestecă pentru a obține un amestec omogen. Acest preparat poate fi administrat cu o rată de aproximativ 5 ml pe zi per vas. (se agită înainte de utilizare). Larvele cu vârstă mai avansată pot primi mai mult.

5. Hrănirea este ajustată în funcție de calitatea apei. Dacă mediul de cultură devine „tulbure”, hrănirea trebuie redusă. Adăugarea de hrană trebuie să fie atent monitorizată. Prea puțină mâncare va conduce la emigrarea larvelor spre coloana de apă, iar o cantitate prea mare de hrană va avea ca rezultat creșterea activității microbiene și concentrații reduse de oxigen. Ambele condiții pot conduce la scăderea ratelor de creștere.

6. Se pot adăuga și câteva celule de alge verzi (de exemplu, *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) atunci când se pregătesc noile vase de cultură.

Hrănirea adulților eclozați

7. Unii cercetători au sugerat că se poate folosi ca hrană pentru adulții eclozați un tampon de vată îmbibat într-o soluție saturată de zaharoză.

▼M6

Eclozare

8. La 20 ± 2 °C, adulții vor începe să eclozeze în vasele de creștere a larvelor după aproximativ 13 – 15 zile. Masculii sunt ușor de identificat după antenele plumoase și după corpul lor fin.

Masele de ouă

9. După ce adulții sunt prezenți în cușca de reproducere, toate vasele de creștere a larvelor trebuie să fie verificate de trei ori pe săptămână, pentru a observa depunerea de mase de ouă gelatinoase. Dacă acestea apar, masele de ouă trebuie să fie înlăturate cu atenție. Ele trebuie să fie transferate într-un vas mic, care conține un eșantion din apa în care au crescut. Masele de ouă sunt utilizate pentru a începe un nou vas de cultură (de exemplu, 2 – 4 mase de ouă /vas) sau sunt folosite pentru teste de toxicitate.

10. Larvele în primul stadiu trebuie să eclozeze după 2 – 3 zile.

Pregătirea de noi vase de cultură

11. După constituirea culturilor, se poate pregăti un nou vas de cultură larvară o dată pe săptămână sau mai puțin frecvent, în funcție de cerințele de testare, prin înlăturarea vaselor mai vechi după ce chironomidele adulte au eclozat. Cu ajutorul acestui sistem, se va asigura o cantitate regulată de adulți, cu minimum de efort.

Pregătirea soluțiilor de testare „M4” și „M7”

12. Elendt (1990) a descris mediul „M4”. Mediul „M7” este pregătit în același mod ca mediul „M4”, cu excepția substanțelor indicate în tabelul 1 pentru care concentrațiile sunt de patru ori mai mici în cazul „M7” în raport cu „M4”. Soluția de testare nu trebuie pregătită conform indicațiilor Elendt și Bias (1990) deoarece concentrațiile de $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 și K_2HPO_4 indicate pentru pregătirea soluțiilor stoc nu sunt adecvate.

Pregătirea mediului „M7”

13. Fiecare soluție stoc (I) este preparată individual, iar din aceste soluții stoc (I) se prepară o soluție stoc combinată (II) (a se vedea tabelul 1). 50 de ml din soluția stoc combinată (II) și cantitățile din fiecare soluție stoc de macronutrienți care sunt indicate în tabelul 2 sunt adăugate până la 1 litru cu apă deionizată pentru a pregăti mediul „M7”. Se prepară o soluție stoc de vitamine, prin adăugarea a trei vitamine la apa deionizată, așa cum se indică în tabelul 3, iar 0,1 ml din soluția stoc de vitamine combinată se adaugă la mediul final „M7” cu puțin timp înainte de utilizare. Soluția stoc combinată de vitamine se păstrează în stare înghețată, în mici alicote. Mediul este aerat și stabilizat.

Tabelul 1

Soluții stoc de microelemente pentru mediile M4 și M7

Soluții stoc (I)	Cantitate (mg) adăugată la 1 litru de apă deionizată	Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă până la 1 litru cu apă deionizată		Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1)	7 210	1	0,25	0,361	0,09
LiCl (1)	6 120	1	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Soluții stoc (I)	Cantitate (mg) adăugată la 1 litru de apă deionizată	Pentru a prepara soluția stoc combinată (II): se amestecă următoarele cantități (ml) de soluții stoc (I) și se adaugă până la 1 litru cu apă deionizată		Concentrații finale în soluțiile de testare (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1	1	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1	1	0,010	0,010
KI	65	1	1	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1	1	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1	1	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5	1	0,249

(1) Aceste substanțe diferă în M4 și M7, astfel cum s-a indicat mai sus.
(2) Aceste soluții sunt pregătite individual, apoi sunt turnate împreună și autoclavate imediat.

Tabelul 2

Soluții stoc de macronutrienți pentru mediile M4 și M7

	Cantitate adăugată până la 1 litru cu apă deionizată (mg)	Cantitate de soluții stoc de macronutrienți adăugate pentru pregătirea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Tabelul 3

Soluție stoc de vitamine pentru mediile M4 și M7

Toate cele trei soluții de vitamine sunt combinate pentru a se obține o singură soluție stoc de vitamine.

	Cantitate adăugată până la 1 litru cu apă deionizată (mg)	Cantitate de soluție stoc de vitamine adăugată pentru prepararea mediilor M4 și M7 (ml/l)	Concentrații finale în soluțiile de testare M4 și M7 (mg/l)
Clorhidrat de tiamină	750	0,1	0,075
Cianocobalamină (B12)	10	0,1	0,001
Biotină	7,5	0,1	0,00075

REFERINȚE

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: 1157-1167.

▼M6

Apendicele 3

Prepararea sedimentului formulat

COMPOZIȚIA SEDIMENTULUI

Compoziția sedimentului formulat trebuie să fie următoarea:

Constituent	Caracteristici	% din sediment, greutate uscată
Turbă	Mușchi de turbă (Sphagnum), cu pH cât mai apropiat posibil de valoarea 5,5 – 6, fără resturi vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor ≤ 1 mm) și uscat cu aer	4 – 5
Nisip de cuarț	Dimensiunea granulelor: > 50 % dintre particule trebuie să se încadreze în intervalul 50 – 200 µm	75 – 76
Argilă de caolinit	Conținut de caolinit ≥ 30 %	20
Carbon organic	Ajustat prin adăugarea de turbă și nisip	2 (± 0,5)
Carbonat de calciu	$CaCO_3$, pulverizat, chimic pur	0,05 – 0,1
Apă	Conductivitate ≤ 10 µS/cm	30 – 50

PREGĂTIRE

Turba este uscată cu aer și măcinată într-o pulbere fină. O suspensie din cantitatea necesară de pudră de turbă în apă deionizată este preparată utilizând un dispozitiv de omogenizare performant. pH-ul acestei suspensii este ajustat la 5,5 ± 0,5 cu $CaCO_3$. Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la 20 ± 2 °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul, care trebuie să fie de 6 ± 0,5. Apoi, suspensia de turbă este amestecată cu alți constituenți (nisip și argilă caolinică) și cu apă deionizată, pentru a obține un sediment omogen cu un conținut de apă în intervalul de 30–50 % din greutatea uscată a sedimentului. Se măsoară încă o dată pH-ul amestecului final și se ajustează la 6,5 până la 7,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Se prelevează eșantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. Apoi, înainte de utilizarea sa într-un test de toxicitate pentru chironomide, se recomandă ca sedimentul formulat să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior.

DEPOZITARE

Constituenții uscați destinați preparării sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul formulat (umed) nu trebuie să fie depozitat înainte de utilizarea sa în test. El trebuie să fie folosit imediat după perioada de condiționare de 7 zile, cu care se încheie prepararea sa.

REFERINȚE

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Apendicele 4

Caracteristicile chimice ale unei ape de diluție acceptabile

CONSTITUENT	CONCENTRAȚII
Materie particulată	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Duritate ca $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Clor rezidual	< 10 µg/l
Total pesticide organofosforice	< 50 ng/l
Total pesticide organofosforice plus bifenili policloruraţi	< 50 ng/l
Clor organic total	< 25 ng/l

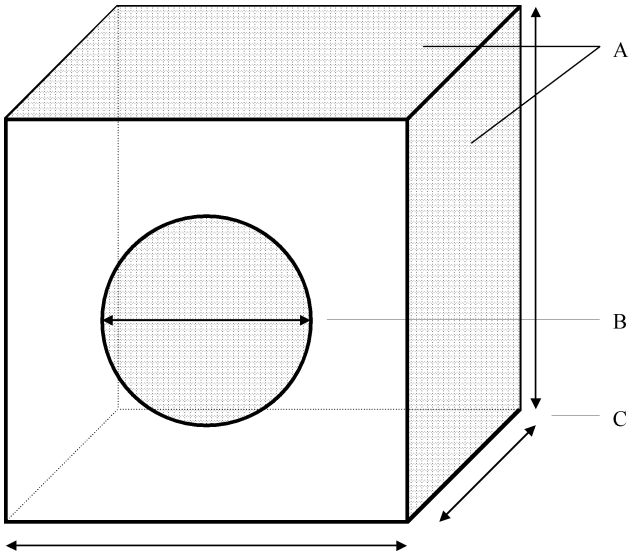
(*) Totuși, trebuie notat faptul că dacă se bănuiește că există o interacțiune între ionii care determină duritatea apei și substanța chimică testată, trebuie să se utilizeze o apă cu duritate mai mică (astfel, în această situație nu trebuie să se folosească mediu Elendt M4).

▼**M6**

Apendicele 5

Orientări privind efectuarea testului

Exemplu de cuşcă de reproducere:



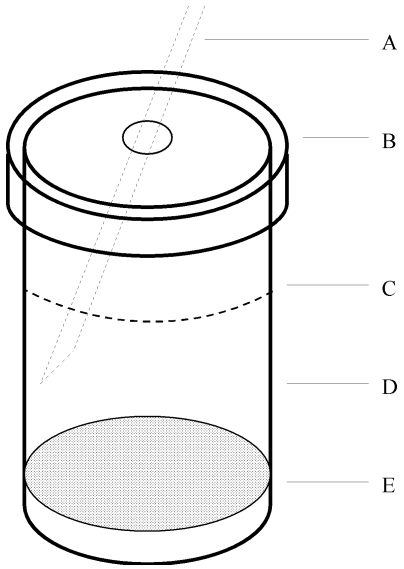
A: plasă în partea superioară şi cel puţin pe una dintre părţile laterale ale cuştii (dimensiunea ochiurilor de aproximativ 1 mm)

B: deschidere pentru introducerea adulţilor eclozaţi în interiorul cuştii de reproducere şi pentru îndepărtarea maselor de ouă depuse din vasele de cristalizare (nu se indică în acest grafic)

C: cuşti de reproducere cu dimensiuni de minimum 30 cm lungime, 30 cm înălţime şi 30 cm lăţime

▼**M6**

Exemplu de vas de testare:



A: pipetă Pasteur pentru alimentarea cu aer a apei acoperitoare

B: capac din sticlă pentru prevenirea evadării chironomidelor eclozate

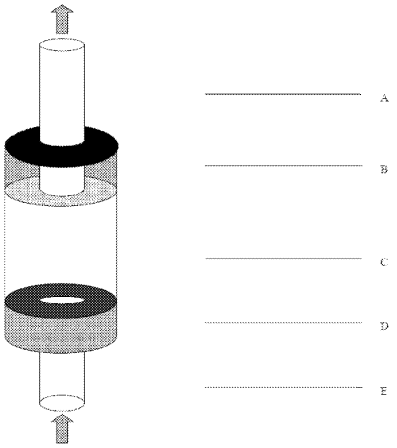
C: suprafața stratului de apă

D: vas de testare (pahar de laborator din sticlă de minimum 600 ml)

E: strat de sediment

▼**M6**

Exemplu de exhaustor pentru capturarea chironomidelor adulte (săgețile indica direcția fluxului de aer):



A: eprubetă din sticlă (diametru interior de aproximativ 5 mm) conectat la o pompă cu autoamorsare

B: dop din cauciuc vulcanizat, perforat cu tub din sticlă (A). În interior, deschiderea tubului de sticlă (A) este acoperită cu bumbac și o plasă (dimensiunea ochiurilor de aproximativ 1 mm) pentru a preveni deteriorarea chironomidelor atunci când acestea sunt aspirate în exhaustor

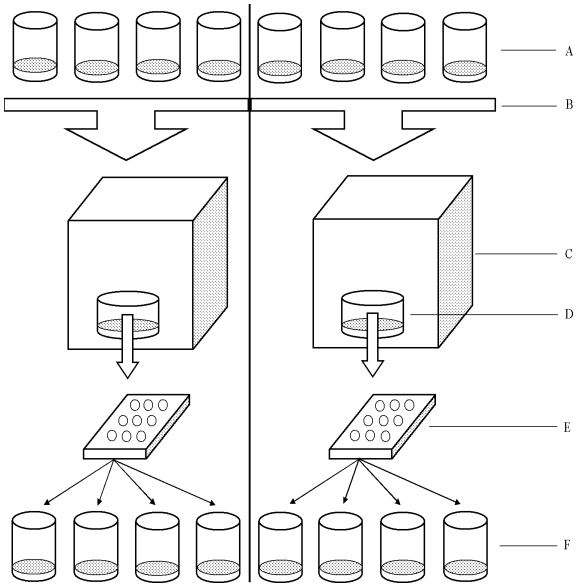
C: recipient transparent (din plastic sau din sticlă, cu o lungime de aproximativ 15 cm) pentru chironomidele capturate

D: dop din cauciuc vulcanizat, perforat cu tub (E). Pentru eliberarea chironomidelor în cușca de reproducere, sonda D se eliberează din recipientul C

E: tub (din plastic sau din sticlă, cu un diametru interior de aproximativ 8 mm) pentru colectarea chironomidelor adulte din vas

▼**M6**

Prezentare schematică a unui test care cuprinde ciclul de viață:



A: prima generație – vasele de testare car conțin un sistem sediment-apă, opt replici, 20 de larve în primul stadiu larvar per vas

B: patru vase de testare pentru fiecare cușcă de reproducere, A și B

C: cuști de reproducere (A și B) pentru formare de roiuri, împerechere și depunere de ouă

D: vase de cristalizare pentru depunerea șiragurilor de ouă

E: microplăci, câte una pentru fiecare șirag de ouă

F: a doua generație – vase de testare care conțin un sistem sediment-apă, opt replici, 20 de larve în primul stadiu larvar per vas.

▼M6

C.41. TEST DE DEZVOLTARE SEXUALĂ A PEȘTILOR

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 234 (2011). Ea se bazează pe o decizie din 1998 de dezvoltare a unor noi metode de testare sau de actualizare a metodelor de testare existente pentru screeningul și testarea potențialelor perturbatori endocrini. Testul de dezvoltare sexuală a peștilor (*Fish Sexual Development Test* – FSDT) a fost identificat ca o metodă de testare promițătoare care acoperă un stadiu de viață la pești receptiv la substanțe chimice estrogenice și androgenice. Metoda de testare a făcut obiectul unei validări interlaboratoare în perioada 2006 – 2010, prin ea fiind validate *Oryzias latipes*, peștele-zebră (*Danio rerio*) și ghidrinul (*Gasterosteus aculeatus*), *Pimephales promelas* fiind parțial validată (41)(42)(43). Acest protocol include *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștele-zebră. Protocolul reprezintă, în principiu, o îmbunătățire a Orientării TG nr. 210 a OCDE *Fish, Early Life Stage Toxicity Test* (Pește, Test de toxicitate în primele stadii de viață) (1), în cadrul căreia expunerea se continuă până când peștii se diferențiază sexual, adică aproximativ la 60 de zile de la eclozare (*days post-hatch* – dph) pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștele-zebră (perioada de expunere poate fi mai scurtă sau mai lungă pentru alte specii, care vor fi validate în viitor) și la care se adaugă parametri studiați care reflectă starea endocrină. FSDT evaluează efectele în primele stadii de viață și potențialele efecte negative ale substanțelor chimice presupuse a avea un efect de perturbare endocrină (de exemplu estrogeni, androgeni și inhibitori de steroidogeneză) asupra dezvoltării sexuale. Combinația celor doi parametri endocrini studiați principali, concentrația de vitelogenină (VTG) și raportul fenotipic între sexe permite testului să indice modul de acțiune al substanței chimice testate. Ca urmare a schimbării populațional relevante în raportul fenotipică al sexelor, FSDT poate fi utilizat pentru evaluarea pericolelor și a riscurilor. Cu toate acestea, în cazul în care testul este utilizat pentru evaluarea pericolelor sau a riscurilor, nu trebuie să se folosească ghidrinul deoarece datele de validare disponibile până în prezent au arătat că pentru această specie modificările raportului fenotipic al sexelor de către substanțele chimice testate au fost rare.

2. Protocolul se bazează pe pești expuși prin intermediul apei la substanțe chimice în timpul perioadei sexuale labile în care se așteaptă ca peștele să fie mai sensibil la efectele substanțelor chimice cu efect de perturbare endocrină care interferează cu dezvoltarea sexuală. Doi parametri studiați principali sunt măsurați ca indicatori ai anomaliilor de dezvoltare cauzate de efecte endocrine, concentrația de VTG și raportul între sexe (proporția sexelor) determinate prin intermediul histologiei gonadelor. Histopatologia gonadală (evaluarea și determinarea stadiilor ovocitelor și a celulelor spermatogenetice) este opțională. În plus, sexul genetic este determinat ori de câte ori este posibil (de exemplu, pentru *Oryzias latipes* și ghidrin). Prezența unui marker al sexului genetic constituie un avantaj considerabil deoarece crește puterea datelor statistice referitoare la raportul sexelor și permite detectarea inversării sexului fenotipic individual. Alți parametri studiați apicali care ar trebui măsurați includ rata de eclozare, supraviețuirea, lungimea și greutatea corporală. Metoda de testare ar putea fi adaptabilă la alte specii decât cele menționate mai sus, cu condiția ca celelalte specii să fie supuse unui proces de validare echivalent celui realizat pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștele-zebră, ca pești de control să fie diferențiați sexual la sfârșitul testului, ca nivelurile de VTG să fie suficient de mari pentru a detecta variații semnificative determinate de substanțe chimice și ca sensibilitatea sistemului de testare să fie stabilită utilizând substanțe chimice de referință cu activitate endocrină [(anti)estrogenice, (anti)androgenice, inhibitori de aromatază etc]. În plus, orice raport sau rapoarte de validare care se referă la datele FSDT utilizând alte specii trebuie să fie revizuit(e) de către OCDE, iar rezultatele validării trebuie să fie considerate ca satisfăcătoare.

▼M6

Considerații inițiale și limitări

3. Vitelogenina (VTG) este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la estrogenul endogen circulant (2). Este un precursor al proteinelor din vitelus și, după ce este produsă în ficat, circulă în fluxul sanguin la ovar de unde este preluată și modificată de ovocitele în dezvoltare. Sinteza VTG este foarte limitată, deși detectabilă, la peștii imaturi și la peștii adulți masculi, deoarece acestora le lipsește estrogenul circulant suficient. Cu toate acestea, ficatul este capabil să sintetizeze și să secrete VTG ca răspuns la stimularea cu estrogen exogen (3)(4)(5).

4. Măsurarea VTG servește la detectarea substanțelor chimice cu moduri de acțiune estrogenice, antiestrogenice, androgenice și a substanțelor chimice care interferează cu steroidogeneza, ca de exemplu inhibitorii de aromatază. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției de VTG la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter pares*. Inducția de VTG a fost demonstrată și în urma expunerii la androgeni aromatizabili (6)(7). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17β-estradiol, determină o diminuare a concentrației de VTG, care este utilizată pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei sau, în sens mai larg, a inhibitorilor steroidogenezei (33). Relevanța biologică a răspunsului VTG ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este stabilită și a fost amplu documentată (8)(9). Cu toate acestea, este posibil ca producția de VTG la femele să fie, de asemenea, afectată de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice neendocrine.

5. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate și standardizate cu succes pentru utilizarea de rutină în vederea cuantificării VTG în eșantioanele de sânge, ficat, organism întreg sau omogenat din cap/coadă colectate de la pești individuali. Acesta este cazul pentru peștele-zebră, ghidrini și *Oryzias latipes*, precum și pentru specia parțial validată *Pimephales promelas*; există disponibile metode testare prin imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA) specifice de specie, care utilizează imunochimia pentru cuantificarea VTG (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). Pentru *Oryzias latipes* și peștele-zebră există o corelație bună între VTG măsurată din eșantioane de plasmă sanguină, ficat și omogenat, deși acestea din urmă tinde să arate valori ușor mai mici decât plasma (17)(18)(19). Apendicele 5 conține procedurile recomandate pentru prelevările de eșantioane efectuate în scopul analizării VTG.

6. Schimbarea raportului fenotipic al sexelor (proporția sexelor) constituie un parametru studiat care reflectă inversarea sexelor. În principiu, substanțele chimice cu efect estrogenic, antiestrogenic, androgenic, antiandrogenic și de inhibare a steroidogenezei pot afecta raportul sexelor la peștii în dezvoltare (20). S-a arătat că această inversare a sexelor este parțial reversibilă în cazul peștelui-zebră (21) în urma expunerii la o substanță chimică cu efect estrogenic, în timp ce inversarea sexelor în urma expunerii la substanțe chimice cu efect androgenic este permanentă (30). Sexul este definit ca femelă, mascul, hermafrodit (ovocite și celule spermatogenetice într-o singură gonadă) sau nediferențiat, determinat la pești individuali prin examinarea histologică a gonadelor. Orientări sunt furnizate în apendicele 7 și în documentul intitulat *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (Document OCDE de orientare privind diagnosticul histopatologiei influențate endocrin a gonadelor de pește) (22).

7. Sexul genetic este examinat prin markeri genetici atunci când aceștia există la o anumită specie de pești. În ceea ce privește *Oryzias latipes*, genele de femele XX sau de masculi YY pot fi detectate prin metoda reacției în lanț a

▼M6

polimerazei (PCR) sau poate fi analizată gena domeniului DM legată de Y (DMY) (DMY negativ sau pozitiv) astfel cum se descrie în (23)(24). În ceea ce privește ghidrinul, există o metodă echivalentă metodei PCR pentru determinarea sexului genetic, descrisă în apendicele 10. În cazul în care sexul genetic poate fi legat în mod individual de sexul fenotipic, puterea testului este îmbunătățită și, prin urmare, sexul genetic trebuie determinat la specii cu markeri ai sexului genetic documentați.

8. Cei doi parametri studiați endocrini principali, VTG și raportul sexelor, pot demonstra, în combinație, modul de acțiune endocrin (MOA) al substanței chimice (tabelul 1). Raportul sexelor este un biomarker relevant pentru populație (25)(26) și pentru unele moduri de acțiune bine definite, rezultatele FSDT pot fi utilizate în scopul evaluării pericolelor și a riscurilor dacă se consideră necesar de către agenția de reglementare. Aceste moduri de acțiune sunt în prezent cele cu efect estrogenic, androgenic și de inhibare a steroidogenezei.

Table 1

Reacția parametrilor endocrini studiați la diferite moduri de acțiune ale substanțelor chimice:

↑ = creștere, ↓ = scădere, — = neinvestigată

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Raportul sexelor	Referințe
Agonist estrogenic slab	↑	↑	↑♀ sau ↑Nedif	(27)(40)
Agonist estrogenic puternic	↑	↑	↑♀ sau ↑Nedif, Nr. ♂	(28)(40)
Antagonist estrogenic	—	—	↓♀, ↑Nedif	(29)
Agonist androgenic	↓ sau —	↓ sau —	↑ ♂, Nr. ♀	(28)(30)
Antagonist androgenic	—	—	↑♀ ↑Hermafrodit	(31)
Inhibitor al aromatazei	↓	↓	↓♀	(33)

9. FSDT nu cuprinde stadiul de viață reproductiv al peștilor și, prin urmare, substanțele chimice care se presupune că afectează reproducerea la concentrații mai mici decât dezvoltarea sexuală trebuie să fie examinate în cadrul unui test care să cuprindă reproducerea.

10. Definițiile utilizate în scopul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

11. Testul FSDT *in vivo* este destinat detectării substanțelor chimice cu proprietăți androgenice și estrogenice, precum și cu proprietăți antiandrogenice, antiestrogenice și de inhibare a steroidogenezei. Fazele de validare a FSDT (1 și 2) au cuprins substanțele chimice cu proprietăți estrogenice, androgenice și de inhibare a steroidogenezei. Efectele în cadrul FSDT ale antagoniști estrogenici și androgenici sunt ilustrate în tabelul 1, dar aceste MOA sunt mai puțin documentate în prezent.

PRINCIPIUL TESTULUI

12. În cadrul testului, sunt expuși pești, din ouă recent fertilizate, până la finalizarea diferențierii sexuale, la cel puțin trei concentrații ale substanței chimice testate dizolvate în apă. Testul trebuie să se desfășoare în flux continuu, cu excepția cazului în care nu este posibil din cauza disponibilității sau naturii (de exemplu, solubilitate limitată) a substanței testate. Testul începe cu introducerea ouălor nou fertilizate (înainte de divizarea

▼M6

discului embrionar) în camerele de testare. Încărcarea camerelor este descrisă pentru fiecare specie la punctul 27. Pentru speciile de pești validate, *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștele-zebră, testul se termină la 60 dph. La terminarea testului, toți peștii sunt eutanasiați. Un eșantion biologic (plasmă sanguină, ficat sau omogenat cap/coadă) este colectată pentru analiza VTG din fiecare pește, iar partea rămasă este fixată pentru evaluarea histologică a gonadelor în vederea determinării sexul fenotipic; opțional, se poate realiza histopatologia (de exemplu determinarea stadializarea gonadelor, severitatea hermafroditismului). Se prelevează un eșantion biologic (din înotătoarea anală sau dorsală) pentru determinarea sexului genetic la specii care posedă markeri adecvați (apendicele 9 și 10).

13. O prezentare generală a condițiilor de testare relevante specifice pentru speciile validate: *Oryzias latipes*, ghidrinul și peștele-zebră, este furnizată în apendicele 2.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

14. Rezultatele unui test de toxicitate acută sau ale unui alt test de toxicitate pe termen scurt [de exemplu, metoda de testare C.14 (34) și Orientarea TG nr. 210 a OCDE (1)] efectuate de preferință cu speciile alese pentru acest test, trebuie să fie disponibile. Aceasta înseamnă că se cunosc solubilitatea în apă și presiunea vaporilor substanței chimice testate, precum și că există disponibilă o metodă analitică fiabilă pentru cuantificarea substanței chimice în camerele de testare, a cărei acurateţ̦e și ale cărei limite de detecție sunt cunoscute.

15. Alte informații utile includ formula structurală, puritatea substanței chimice, stabilitatea în apă și la lumină, pKa, P_{ow} și rezultatele unui test privind ușurința biodegradabilității (metoda de testare C.4) (35).

Criteriile de acceptare a testului

16. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— Concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie de cel puțin 60 % din valoarea de saturație în aer (ASV) pe toată durata testului,

— Temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între camerele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută în intervalul de temperatură specificat pentru specia testată (apendicele 2);

— O metodă validată pentru analiza substanței chimice de expunere cu o limită de detecție cu mult sub cea mai mică concentrație nominală trebuie să fie disponibilă și trebuie colectate dovezi pentru a demonstra că respectivele concentrații ale substanței chimice testate în soluție au fost menținute în mod satisfăcător în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate;

— Supraviețuirea generală a ouălor fertilizate în controale și, dacă este relevant, în controalele cu solvent, trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în apendicele 2;

— Criteriile de acceptare legate de creștere și proporțiile sexelor la terminarea testului se bazează pe date obținute din grupurile de control (controale cu solvent și apă agregate, cu excepția cazului în care sunt semnificativ diferite, când sunt utilizate doar cele cu solvent):

▼M6

		Oryzias latipes	peștele zebră	ghidrin
Creștere	Greutatea umedă a peștilor, uscați prin tamponare	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Lungime (lungime standard)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Raportul sexelor (% masculi sau femele)		30 – 70 %	30 – 70 %	30 – 70 %

— Atunci când se utilizează un solvent, acesta nu trebuie să aibă niciun efect semnificativ statistic asupra supraviețuirii și nu trebuie să producă nicio perturbare endocrină sau să aibă alte efecte adverse asupra stadiilor timpurii de viață, astfel cum se indică prin controlul cu solvent.

Dacă se observă o abatere de la criteriile de acceptare a testului, consecințele trebuie să fie luate în considerare în relație cu fiabilitatea datelor testului, iar aceste considerente trebuie incluse în raport.

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Camerele de testare

17. Poate fi utilizată orice cameră de testare din sticlă, oțel inoxidabil sau dintr-un alt material chimic inert. Dimensiunile camerelor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite respectarea vitezei de încărcare menționate mai jos. Se recomandă poziționarea aleatorie a camerelor de testare în zona de testare. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor cu fiecare concentrație prezentă în fiecare bloc este de preferat unui protocol complet aleatoriu. Camerele de testare trebuie protejate împotriva oricărei perturbări nedorite.

Alegerea speciei

18. În apendicele 2 se află o listă de specii de pești recomandate. Procedura necesară includerii de noi specii este furnizată la punctul 2.

Menținerea peștilor parentali

19. Detalii privind menținerea peștilor parentali în condiții satisfăcătoare pot fi găsite în Orientarea TG nr. 210 a OCDE (1). Peștii parentali trebuie hrăniți o dată sau de două ori pe zi cu hrană adecvată.

Manipularea embrionilor și a larvelor

20. Inițial, embrionii și larvele pot fi expuse în cadrul unei camere principale în camere mai mici din sticlă sau din oțel inoxidabil, prevăzute cu plase laterale sau la capete pentru a permite fluxul substanței chimice testate în cameră. Curgerea neturbulentă prin aceste camere de mici dimensiuni poate fi indusă prin suspendarea lor de un braț mobil, care le deplasează în sus și în jos, dar astfel încât să mențină organismele imersate.

21. Când au fost folosite recipiente, grile sau plase pentru a păstra ouăle în camera principală de testare, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor, cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica peștii să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer, iar plasele nu trebuie utilizate pentru a elibera peștii din recipientele pentru ouă. Momentul transferului variază în funcție de specie, iar transferul nu este întotdeauna necesar.

▼M6

Apă

22. Orice apă în care specia de testare prezintă supraviețuirea controlului cel puțin la fel de bună ca în apa descrisă în apendicele 3 este adecvată ca apă de testare. Trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Pentru ca apa de diluție să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu prin reacție cu substanța chimică testată) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie prelevate periodic eșantioane pentru analiză. Carbonul organic total, conductivitatea, pH-ul și materiile solide în suspensie se măsoară, de exemplu, la fiecare trei luni dacă se știe că apa de diluție este relativ constantă în calitate. Trebuie efectuate măsurători ale metalelor grele (de exemplu Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), ale anionilor și cationilor majori (de exemplu Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) și ale pesticidelor, dacă calitatea apei este îndoielnică. Detalii privind analiza substanței chimice și colectarea apei pot fi găsite la punctul 34.

Soluții de testare

23. Sistemul cu flux continuu trebuie utilizat dacă este posibil din punct de vedere practic. Pentru testele în regim de flux continuu este necesar un sistem care să disperseze și să dilueze continuu o soluție stoc de substanță chimică testată (de exemplu pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturație) pentru a asigura o serie de concentrații în camerele de testare. Debitele soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin de cinci ori volumul unei camere, în 24 de ore, este considerat adecvat (1). Trebuie avut grijă să se evite folosirea de țevi din plastic sau alte materiale, dintre care unele pot conține substanțe active din punct de vedere biologic sau care ar putea absorbi substanța chimică testată.

24. Soluția stoc se prepară de preferință, fără folosirea de solvenți, prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice testate în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau ultrasunete). În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de dizolvat în apă, trebuie urmate procedurile descrise în documentul *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures should be followed* (Document OCDE de orientare privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile) (36). În unele cazuri, folosirea solvenților trebuie evitată, însă aceasta poate fi necesară în unele cazuri pentru a realiza o soluție stoc cu concentrație corespunzătoare. Exemple de solvenți corespunzători sunt oferite în referința (36).

25. Condițiile de testare semistatice trebuie evitate, cu excepția cazurilor când este furnizată o argumentație privind motivele imperioase asociate cu substanța chimică testată (de exemplu, stabilitatea, disponibilitatea limitată, costul ridicat sau pericolul). Pentru tehnicile semistatice, pot fi urmate două proceduri de reînnoire diferite. Fie sunt preparate noi soluții de testare în camere curate, iar ouăle și larvele care au supraviețuit sunt transferate cu grijă în noile camere, fie organismele de testare sunt reținute în camerele de testare în timp ce o proporție (cel puțin două treimi) din apa de testare este schimbată zilnic.

PROCEDURA

Condiții de expunere

Colectarea ouălor și durata

26. Pentru evitarea rezultatelor incorecte din cauze genetice, ouăle sunt colectate de la un minimum trei cupluri sau grupuri reproducătoare, amestecate și selectate în mod aleatoriu pentru a începe testul. Pentru ghidrin, a se vedea descrierea fertilizării artificiale din apendicele 11. Testul ar trebui să înceapă cât mai curând posibil după ce ouăle au fost fertilizate, embrionii fiind de

▼M6

preferință scufundați în soluțiile de testare înainte de începerea divizării discului embrionar sau cât mai aproape posibil după această etapă și nu mai târziu de 12 ore de la fertilizare. Testul ar trebui să continue până la finalizarea diferențierii sexuale în grupul de control (60 dph pentru *Oryzias latipes*, ghidrin și peștele-zebră).

Încărcare

27. Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie de cel puțin 120 per concentrație împărțite între minimum 4 replici (este acceptată alocarea radicalică la control). Ouăle trebuie să fie distribuite în mod aleatoriu (prin utilizarea tabelelor statistice pentru procedura aleatorie) între tratamente. Viteza de încărcare (pentru definiție, a se vedea apendicele 1) trebuie să fie suficient de mică pentru ca o concentrație de oxigen dizolvat de cel puțin 60 % din ASV să poată fi menținută fără aerarea directă a camerelor. Pentru testele în flux continuu este recomandată o viteză de încărcare care să nu depășească 0,5 g/l în 24 de ore și 5 g/l de soluție în orice moment. Nu mai târziu de 28 zile de la fertilizare numărul de pești per replică trebuie redistribuit, astfel încât fiecare replică să conțină un număr egal de pești, în măsura în care este posibil. Dacă survine mortalitate asociată expunerii, numărul de replici trebuie redus în mod corespunzător, astfel încât densitatea peștilor între nivelurile de tratament să se mențină egală, în măsura în care este posibil.

Lumina și temperatura

28. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (a se vedea apendicele 2 pentru condițiile experimentale pentru FSDT).

Hrănire

29. Hrana și hrănirea sunt critice, și este esențial administrarea unei hrane corecte pentru fiecare etapă la intervale adecvate de timp și la un nivel suficient pentru a susține creșterea normală. Hrănirea ar trebui să se realizeze *ad libitum* minimalizând surplusul. Pentru a obține o viteză de creștere suficientă, peștii trebui hrăniți cel puțin de două ori pe zi (se acceptă o dată pe zi în weekend), cu o diferență de cel puțin trei ore între fiecare administrare de hrană. Surplusul de hrană și excrementele trebuie îndepărtate, după necesități, pentru a evita acumularea de deșeuri. Pe măsură ce se dobândește experiență, hrănirea și regimurile de hrănire sunt în permanență perfecționate pentru a îmbunătăți supraviețuire și pentru a optimiza creșterea. Prin urmare, regimul propus ar trebui confirmat de experți recunoscuți. Hrănirea trebuie oprită cu 24 de ore înainte de finalizarea testului. Exemple de hrană adecvată sunt prezentate în apendicele 2 [a se vedea de asemenea OECD *Fish Testing Framework* (39)]

Concentrațiile testate

30. Substanțele chimice testate trebuie spațiate astfel cum se descrie în apendicele 4. Trebuie utilizate cel puțin trei concentrații de testare în cel puțin patru replici. La alegerea intervalului de concentrații de testare trebuie luată în considerare curba reprezentând LC_{50} în funcție de perioada de expunere rezultată din studiile de toxicitate acută. Dacă datele urmează să fie folosite pentru evaluarea riscurilor, se recomandă cinci concentrații de testare.

31. Concentrațiile de substanță chimică mai mari de 10 % din concentrația acută la adulți LC_{50} sau 10 mg/l, oricare este mai mică, nu trebuie să fie testate. Concentrația de testare maximă trebuie să fie de 10 % din LC_{50} pentru larve/exemplare tinere.

▼M6

Controale

32. Un control cu apă de diluție (≥ 4 replici) și, dacă este relevant, un control cu solvent (≥ 4 replici) trebuie utilizate în plus față concentrațiile de testare. Numai solvenții care au fost analizați și s-a demonstrat că nu au nicio influență statistic semnificativă asupra parametrilor studiați trebuie să fie utilizați în testare.

33. În cazul în care se folosește un solvent, concentrația sa finală nu trebuie să fie mai mare de 0,1 ml/l (36) și trebuie să aibă aceeași concentrație în toate camerele de testare, cu excepția controlului cu apă de diluție. Cu toate acestea, trebuie depuse eforturi pentru a evita utilizarea de astfel de solvenți sau pentru a menține concentrațiile solventului la o valoare minimă.

Frecvența determinărilor și măsurătorilor analitice

34. Analiza chimică a substanței chimice testate trebuie efectuată înainte de începerea testului pentru a verifica respectarea criteriile de acceptanță. Toate replicile trebuie analizate individual la începutul și la terminarea testului. O replică per concentrație de testare trebuie analizată cel puțin o dată pe săptămână pe durata testului, făcând schimbări sistematice între replici (1,2,3,4,1,2…). În cazul în care eșantioanele sunt depozitate pentru a fi analizate ulterior, metoda de depozitare a eșantioanelor trebuie să fie validată în prealabil. Eșantioanele trebuie filtrate (de exemplu, utilizând un filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugate pentru a se asigura că determinările sunt realizate pe substanța chimică din soluția veritabilă.

35. Pe durata testării, oxigenul dizolvat, pH-ul, duritatea totală, conductivitate, salinitatea (dacă este relevantă) și temperatura trebuie să fie măsurate în toate camerele de testare. Ca o condiție minimă, oxigenul dizolvat, salinitatea (dacă este relevantă) și temperatura trebuie să fie măsurate săptămânal, iar pH-ul, conductivitatea și duritatea la începutul și la sfârșitul testului. De preferință, temperatura trebuie să fie monitorizată continuu cel puțin într-una dintre camerele de testare.

36. Rezultatele trebuie să se bazeze pe concentrațiile măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței chimice testate în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de ± 20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi bazate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.

Observații și măsurători

Stadiul dezvoltării embrionare

37. Expunerea trebuie să înceapă imediat ce este posibil după fertilizare și înainte de începerea divizării discului embrionar și nu mai târziu de 12 ore de la fertilizare pentru a asigura expunerea pe durata stadiului de dezvoltare embrionară timpurie.

Eclozarea și supraviețuirea

38. Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să fie făcute cel puțin o dată pe zi și numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. Embrionii, larvele și exemplarele tinere de pești morți trebuie îndepărtate imediat după ce au fost observate întrucât se pot descompune rapid și pot fi dezintegrate prin acțiunile altor pești. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu lovi sau leza fizic ouăle/larvele din vecinătate, acestea fiind extrem de delicate și de sensibile. Simptomele care indică moartea variază în funcție de stadiul de viață:

— pentru ouă: în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a transluciditățiii și schimbarea colorației, provocată de coagularea și/sau precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;

▼M6

— pentru larve și exemplarele tinere de pești: imobilitatea și/sau absența mișcărilor respiratorii și/sau absența bătăilor inimii și/sau colorația alb-opacă a sistemului nervos central și/sau absența reacției la stimuli mecanici.

Aspectul anormal

39. Numărul de larve sau de pești care prezintă anomalii legate de forma corpului trebuie înregistrat, iar aspectul și natura anomaliei trebuie descrise. Trebuie remarcat că embrionii și larve anormale apar în mod natural și numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile de control ale unor specii. Animalele anormale nu trebuie îndepărtate din camerele de testare decât atunci când sunt moarte. Cu toate acestea, în conformitate cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, dacă anomaliile duc la durere, suferință și stres sau vătămări de durată, iar moartea poate fi prezisă în mod fiabil, animalele trebuie anesteziate și eutanasiate în conformitate cu descrierea de la punctul 44 și considerate a contribui la mortalitate în analiza datelor.

Comportamentul anormal

40. Anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat, imobilitatea sau hrănirea atipice trebuie înregistrate la capitolul aspect.

Greutate

41. La sfârșitul testului, toți peștii supraviețuitori trebuie eutanasiați (anesteziați dacă trebuie prelevate de eșantioane de sânge), iar greutatea umedă individuală (uscare prin tamponare) trebuie măsurată.

Lungime

42. La sfârșitul testului, lungimile individuale (lungimea standard) trebuie măsurate.

43. Aceste observații vor face ca o parte sau toate datele următoare să fie disponibile pentru raportare.

— mortalitatea cumulată;

— numărul de pești sănătoși la sfârșitul testului;

— timpul până la începerea eclozării și până la sfârșitul eclozării;

— lungimea și greutatea animalelor supraviețuitoare;

— numărul larvelor deformate;

— numărul peștilor care prezintă un comportament anormal.

Eșantionarea peștilor

44. Eșantionarea peștilor se realizează la terminarea testului. Peștii eșantionați trebuie eutanasiați cu, de exemplu, MS-222 (100 – 500 mg per l tamponat cu 200 mg $NaHCO_3$ per l) sau FA-100 (4-alil-2-metoxifenol: eugenol) și măsurați și cântăriți individual ca greutate umedă (uscare prin tamponare) sau anesteziați dacă un eșantion de sânge trebuie prelevat (a se vedea punctul 49).

Selectarea pentru analiza VTG și determinarea sexului prin evaluarea histologică

45. Toți peștii trebuie eșantionați și pregătiți pentru analiza sexului și a VTG. Toți peștii trebuie analizați histologic în vederea determinării sexului. Pentru măsurarea VTG, se acceptă un subeșantion de cel puțin 16 pești din fiecare

▼M6

replică. Mai mulți pești trebuie analizați pentru a determina VTG dacă rezultatele obținute în urma subeșantionării sunt neclare.

46. Procedura de eșantionare pentru VTG și determinarea sexului depinde de metoda de analiză a VTG:

Metoda cu omogenat cap/coadă pentru analiza VTG

47. Peștele este eutanasiat. Capul și coada fiecărui pește se separă de corpul peștelui prin incizii imediat înapoia înotătoarelor pectorale și imediat înaintea înotătoarei dorsale, cu ajutorul unui bisturiu (a se vedea figura 1). Capul și coada fiecărui pește sunt comasate, cântărite și numerotate individual, congelate în azot lichid și depozitate la – 70° sau mai puțin, pentru analiza VTG. Corpul peștelui este numerotat și fixat într-un fixativ adecvat pentru evaluarea histologică (22). Prin utilizarea acestei metode sunt evaluate VTG și histopatologia pentru fiecare individ și o posibilă modificare a nivelului VTG poate fi astfel corelată cu sexul fenotipic al peștilor sau cu sexul genetic (*Oryzias latipes* și ghidrin) al peștilor. Pentru informații suplimentare a se vedea orientările privind omogenizarea (apendicele 5) și orientările privind cuantificarea VTG (apendicele 6).

Metoda cu omogenat din ficat pentru analiza VTG

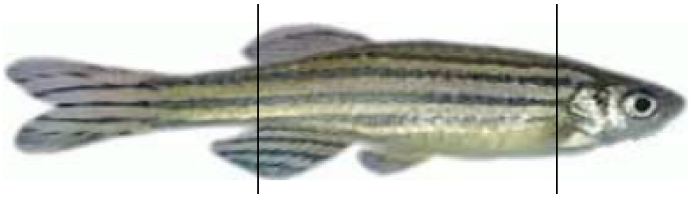
48. Peștele este eutanasiat. Ficatul este excizat și depozita la o temperatură de – 70 °C sau mai mică. Procedurile recomandate pentru excizia ficatului și pretratarea sunt disponibile în Orientarea TG nr. 229 a OCDE (37) sau în capitolul C.37 din prezenta anexă (38). Ficații sunt apoi omogenizați individual, astfel cum se descrie în Orientarea TG nr. 229 a OCDE sau în capitolul C.37 din prezenta anexă. Supernatantul colectat este folosit pentru măsurarea VTG cu o tehnică ELISA omoloagă [a se vedea apendicele 6 pentru un exemplu de cuantificare la peștele-zebră sau Orientarea TG nr. 229 a OCDE (37) pentru *Oryzias latipes*]. Pe baza acestei metode, este posibil, de asemenea, să se obțină date individuale privind peștii atât în ceea ce privește VTG, cât și în ceea ce privește histologia gonadelor.

Metoda cu plasmă sanguină pentru analiza VTG

49. Sângele este colectat de la peștii anesteziați prin puncție cardiacă, din vână caudală sau prin tăierea cozii și este centrifugat la 4 °C pentru colectarea de plasmă. Plasma este depozitată la maximum – 70 °C, până la utilizare. Peștele întreg este eutanasiat și fixat pentru histologie. Atât eșantioanele de plasmă, cât și peștii, sunt numerotați individual pentru a corela nivelurile de VTG cu sexul peștelui.

Figura 1

Modul de incizare a unui pește pentru măsurarea VTG în omogenat din cap/coadă și evaluarea histologică a secțiunii mijlocii.



▼M6

Determinarea sexului genetic

50. Un eșantion biologic pentru determinarea sexului genetic este prelevat din pești aparținând speciilor care posedă markeri corespunzători. Pentru *Oryzias latipes*, se colectează înotătoarea anală sau înotătoarea dorsală. O descriere detaliată este furnizată în apendicele 9 incluzând prelevarea de eșantioane de țesut și determinarea sexului printr-o metodă PCR. De asemenea, pentru ghidrin, o descriere a prelevării de țesut și a determinării sexului prin metoda PCR este furnizată în apendicele 10.

Măsurarea VTG

51. Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă cantitativă, validată din punct de vedere analitic. Informațiile trebuie să fie disponibile pe baza variabilității intra- și interteste a metodei utilizate într-un anumit laborator. Sursa variabilității intra- și interlaboratoare este (cel mai probabil) bazată pe diferitele stadii de dezvoltare a populației de pești. Luând în considerare variabilitatea măsurării VTG, NOEC bazate doar pe acest parametru studiat trebuie tratate cu multă atenție. Sunt disponibile diferite metode pentru evaluarea producerii de VTG în speciile de pești avute în vedere în acest test. O tehnică de măsurare care este relativ sensibilă și specifică este determinarea concentrațiilor de proteine prin intermediul unui test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA). Anticorpi omologi (formați împotriva VTG de la aceeași specie) și cele mai importante standarde omoloage trebuie utilizate.

Determinarea sexului

52. În funcție de procedura de eșantionare a VTG, întregul pește sau secțiunea mijlocie rămasă a fiecărui pește se plasează într-o casetă de procesare etichetată în prealabil și fixată într-un fixator corespunzător pentru determinarea histologică a sexului (opțional și pentru evaluare stadializării gonadale). Orientări privind fixarea și integrarea sunt furnizate în apendicele 7, precum și în documentul intitulat *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (Document OCDE de orientare privind diagnosticul histopatologiei influențate endocrin a gonadelor de pește) (22). După procesare, peștele este integrat în blocuri de parafină. Indivizii trebuie plasați în blocurile de parafină în poziție longitudinală. Cel puțin șase secțiuni longitudinale (cu o grosime de 3 – 5 μm) într-un plan frontal incluzând țesut gonadal de la ambele gonade sunt realizate pentru fiecare individ. Intervalul dintre aceste secțiuni trebuie să fie de aproximativ 50 μm pentru masculi și de 250 μm pentru femele. Totuși, având în vedere că fiecare bloc va conține adesea masculi și femele (dacă în fiecare bloc sunt integrați mai mulți indivizi), intervalul dintre secțiunile acestor blocuri trebuie să fie de aproximativ 50 μm până la obținerea a cel puțin șase secțiuni ale gonadelor pentru fiecare mascul. Prin urmare, intervalul dintre secțiuni poate fi crescut până la aproximativ 250 μm pentru femele. Secțiunile sunt colorate cu hematoxilină și eozină și examinate la microscop optic cu o atenție deosebită acordată sexului (mascul, femelă, hermafrodit sau exemplar nediferențiat). Hermafrodit înseamnă prezența mai multor ovocite în testicul per șase secțiuni analizate sau celule spermatogenetice (da/nu) în ovare. Histopatologia și stadializarea ovarelor și a testiculelor este opțională, însă dacă sunt investigate, rezultatele trebuie analizate statistic și raportate. Trebuie remarcat faptul că unora dintre speciile de pești le lipsește în mod natural o pereche de gonade complet dezvoltate și poate fi prezentă doar o singură gonadă (de exemplu *Oryzias latipes*și, ocazional, peștele-zebră). Toate aceste observațiile trebuie înregistrate.

53. Determinarea sexului genetic pentru exemplarele de *Oryzias latipes* se bazează pe prezența sau pe absența genei care determină sexul masculin la *Oryzias latipes*, DMY, care este situată pe cromozomul Y. Sexul

▼M6

genotipic al *Oryzias latipes* poate fi identificat prin secvențierea genei DMY din ADN-ul extras din, de exemplu, o bucată de înotătoare anală sau dorsală. Prezența DMY indică un exemplar XY (mascul) indiferent de fenotip, în timp ce absența DMY indică un exemplar XX (femelă), indiferent de fenotip (23). Orientări privind pregătirea țesutului și metoda PCR sunt furnizate în apendicele 9. Determinarea sexului genetic în exemplarele de ghidrin se realizează, de asemenea, printr-o metodă PCR, descrisă în apendicele 10.

54. Apariția de exemplare hermafrodite (pentru definiție, a se vedea apendicele 1) trebuie înregistrată.

Caracteristici sexuale secundare

55. Caracteristicile sexuale secundare se află sub controlul endocrin la specii precum *Oryzias latipes*; prin urmare, dacă este posibil, observațiile privind aspectul fizic al peștelui trebuie să fie efectuate la sfârșitul expunerii. În ceea ce privește *Oryzias latipes*, formarea papilară a părții posterioare a înotătoarei anale la femele este sensibilă la androgen. Capitolul C. 37 din prezenta anexă (38) furnizează fotografii relevante ale caracteristicilor sexuale secundare masculine și ale femelelor androgenizate.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

56. Este important ca cel mai puternic test statistic valid să determine parametrul studiat. Replica este unitatea experimentală, însă variabilitatea între replici trebuie inclusă în testarea statistică O organigramă a deciziilor este disponibilă în apendicele 8 pentru a ajuta cu testul statistic cel mai potrivit pentru a fi utilizat pe baza caracteristicilor datelor obținute în test. Nivelul de semnificație statistică este de 0,05 pentru toți parametri studiați incluși.

Proporțiile sexelor și sexul genetic

57. Proporțiile sexelor ar trebui să fie analizate din punctul de vedere al efectului semnificativ (metoda NOEC/LOEC) al expunerii prin Jonckheere-Terpstra (testul Trend), în cazul în care există o relație doză-răspuns monotonă. Dacă se constată absența monotonicității, trebuie aplicat un teste pe perechi: Dacă se poate obține normalitate și varianță omogenă se utilizează testul Dunnett. Dacă este prezentă o varianță eterogenă, se utilizează testul Tamhane-Dunnett. Altfel, se utilizează testul exact Mann-Whitney cu ajustare Bonferroni-Holm. O organigramă care descrie statistica proporțiilor sexelor este furnizată în apendicele 8. Proporțiile sexelor trebuie prezentate în tabele ca proporții de concentrații ± SD pentru masculi, femele, hermafrodiți și exemplare nediferențiate. Semnificația statistică trebuie evidențiată. În raportul de validare a fazei 2 a FSDT sunt prezentate exemple (42). Sexul genetic trebuie raportat ca procent de inversări ale sexului fenotipic al masculilor, femelelor, hermafrodiților și exemplarelor nediferențiate.

Concentrațiile VTG

58. Concentrațiile VTG trebuie analizate din punctul de vedere al efectului semnificativ (metoda NOEC/LOEC) al expunerii. Testul Dunnett este preferabil testului t cu corecție Bonferroni. În cazul aplicării unei corecții Bonferroni, se recomandă corecția Bonferroni-Holm. Trebuie realizată o ajustare pentru transformarea logaritmică a VTG pentru a obține normalitate și omogenitatea variației. Apoi, dacă relația concentrație-răspuns este compatibilă cu monotonicitatea, se preferă testul Jonckheere Terpstra față de oricare dintre cele de mai sus. În cazul în care sunt utilizate teste t sau testul Dunnett, nu este necesară efectuarea unui test F de semnificație ANOVA pentru a continua. Pentru detalii, a se vedea organigrama din

▼M6

apendicele 8. Rezultatele trebuie raportate în tabele ca medii de concentrații ± SD separat pentru masculi, femele, hermafroditi și exemplarele nediferențiate. Semnificativitatea statistică pentru femelele fenotipice și masculii fenotipici trebuie evidențiată. În raportul de validare a fazei 2 a FSDT sunt prezentate exemple (42).

Concentrațiile efective ale substanței chimice testate

59. Concentrațiile efective din cameră ale substanței chimice testate trebuie analizate cu frecvențele descrise la punctul 34. Rezultatele trebuie raportate în tabele sub formă de concentrații medii ± SD per replică, precum și per concentrație, împreună cu informații privind numărul de eșantioane și cu valorile aberante pentru concentrația medie de tratament ± 20 % evidențiată. Exemple pot fi găsite în raportul de validare a fazei 2 a FSDT (42).

Interpretarea rezultatelor

60. Rezultatele testului se interpretează cu precauție atunci când concentrațiile măsurate ale substanței chimice testate apar la niveluri apropiate de limitele de detecție ale metodei analitice.

Raportul privind testul

61. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța chimică testată

— Proprietățile fizico-chimice relevante; datele de identificare chimică, inclusiv puritatea și metoda analitică pentru cuantificare a substanței chimice testate.

Condițiile de testare

— Procedura de testare utilizată (de exemplu cu flux continuu, semistatică/reînnoire); protocolul de testare inclusiv concentrațiile de testare, metoda de preparare a soluțiilor stoc (într-o anexă), frecvența de reînnoire (dacă se utilizează, trebuie indicat agentul de solubilizare și concentrația acestuia);

— Concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în camerele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute (metoda de analiză utilizată trebuie prezentată într-o anexă); dovada că măsurătorile se referă la concentrațiile de substanței chimice testate în soluție veritabilă;

— Calitatea apei în camerele de testare: pH-ul, duritatea, temperatura și concentrația de oxigen dizolvat;

— Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul (tipurile) de hrană, sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele contaminanților (de exemplu, PCBs, PAHs și pesticide organoclorurate), dacă sunt relevante].

Rezultate

— Dovada că controalele au îndeplinit criteriile de validitate: datele privind rata de eclozare trebuie prezentate în tabele ca procente per replică și per concentrație. Valorile aberante din criteriile de acceptanță (în controale) trebuie evidențiate. Supraviețuirea trebuie prezentată ca procent per replică și per concentrație. Valorile aberante din criteriile de valabilitate (în controale) trebuie evidențiate;

— Indicarea clară a rezultatelor obținute privind diferiții parametri studiați observați: supraviețuire embrionilor și succesul eclozării; anomalii externe; lungime și greutate; măsurători ale VTG (ng/g omogenat, ng/ml plasmă sau ng/mg ficat); histologia gonadelor, raportul sexelor,

▼**M6**

datele privind sexul genetic; incidența reacțiilor neobișnuite per pește și orice efect vizibil produs de substanța chimică testată.

62. Rezultatele trebuie prezentate ca valori medii ± deviație standard (*standard deviation* – SD) sau eroare standard (*standard error* – SE). Statisticile trebuie raportate minimum ca NOEC și LOEC și intervale de încredere. Organigrama statistică (apendicele 8) trebuie urmată.

BIBLIOGRAFIE

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), „Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)", Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼**M6**

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), „Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3", pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)", Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)", Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development", Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)", Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Chapter C.14 of this Annex, Fish Juvenile Growth Test.

(35) Chapter C.4 of this Annex, Ready Biodegradability.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Chapter C.37 of this Annex, 21-Day Fish Assay: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio" Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

▼**M6**

Apendicele 1

Abrevieri și definiții

Parametrii studiați apicali: care cauzează efecte la nivelul populației

ASV: Valoarea de saturație din aer (*Air saturation value*)

Biomarker: Care cauzează efecte la nivel individual

Substanța chimică: o substanță sau un amestec.

Dph: Zile de la eclozare (*Days post hatch*)

DMY: Gena domeniului DM Y-specifică necesară pentru dezvoltarea masculilor din specia *Oryzias latipes*

ELISA: Test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

Greutate pește: Greutatea umedă peștilor (uscați prin tamponare)

FSDT: Test de dezvoltare sexuală a peștilor (*Fish Sexual Development Test*)

Axul HPG: Axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

Pești hermafrodiți: Pești care prezintă mai multe ovocite în testicul pe 6 secțiuni analizate sau celule spermatogenetice în ovare (da/nu)

Rate de încărcare: Greutatea umedă a unui pește per volum de apă

MOA: Mod de acțiune

RT-PCR: Reacție de polimerizare în lanț a revers transcriptazei

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

Pești nediferențiați: Pești cu gonade care gonade care nu prezintă celulele germinale vizibile.

VTG: Vitelogenină

▼M6

Apendicele 2

Condiții experimentale pentru FSDT (specii de apă dulce)

1. Specii recomandate	*Oryzias latipes*	Peștele-zebră (*Danio rerio*)	Ghidrinul (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Tipul de test	Flux continuu sau semistatic	Flux continuu sau semistatic	Flux continuu sau semistatic
3. Temperatura apei	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Calitatea luminii	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)
5. Intensitatea luminii	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 080 lux sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale din laborator)
6. Perioadă de expunere la lumină	12-16 h de lumină, 8-12 h de întuneric	12-16 h de lumină, 8-12 h de întuneric	16 h de lumină, 8 h de întuneric
7. Dimensiunea minimă a camerelor de testare	Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l	Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l	Camerele individuale trebuie să conțină un volum de apă de minimum 7 l
8. Schimburile volumice ale soluțiilor de testare	Minimum 5/zi	Minimum 5/zi	Minimum 5/zi
9. Vârsta organismelor testate la începutul expunerii	Ouă recent fertilizate (stadiul de blastulă timpurie)	Ouă recent fertilizate (stadiul de blastulă timpurie)	Ouă recent fertilizate
10. Numărul de ouă per tratament	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Numărul de tratamente	Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)	Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)	Minimum 3 (plus controale corespunzătoare)
12. Numărul de replici per tratament	Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)	Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)	Minimum 4 (cu excepția alocării prin rădăcină pătrată la control)
13. Regimul de hrănire	Artemia vii, creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi.	Hrană specială pentru pești tineri, *Artemia*, creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi.	*Artemia* vii, creveți adulți congelați, hrană sub formă de fulgi etc. Se recomandă administrarea de hrană de două ori pe zi.
14. Aerarea	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 60 % din saturație	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 60 % din saturație	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația OD scade sub 70 % din saturație

▼**M6**

15. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită
16. Durata expunerii la substanța chimică testată	60-dph	60-dph	60-dph
17. Parametri biologici studiați	Succesul eclozării, supraviețuire, morfologie macroscopică, VTG histologia gonadală, sexul genetic, raportul sexelor	Succesul eclozării, supraviețuire Morfologie macroscopică, VTG histologie gonadală, raportul sexelor	Succesul eclozării, supraviețuire Morfologie macroscopică, VTG histologie gonadală, raportul sexelor
18. Criteriile de acceptabilitate a testului pentru replicile comasate ale controalelor	Succesul eclozării > 80 %	Succesul eclozării > 80 %	Succesul eclozării > 80 %
	Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %	Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %	Supraviețuirea ulterioară eclozării ≥ 70 %
	creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 150 mg	creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 75 mg	creșterea (greutatea umedă peștilor uscați prin tamponare) > 120 mg
	Lungime (lungime standard) > 20mm	Lungime (lungime standard) > 14 mm	Lungime (lungime standard) > 20 mm
	Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %	Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %	Raportul sexelor (% masculi sau femele) 30 % – 70 %

▼**M6**

Apendicele 3

Caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile

CONSTITUENT	CONCENTRAȚIE
Materie sub formă de particule	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 mg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Total pesticide organofosforice	< 50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	< 50 ng/l
Clor organic total	< 25 ng/l

▼**M6**

Apendicele 4

Din metoda de testare C.14/Orientări privind concentrațiile de testare

Coloană (numărul de concentrații între 100 și 10, sau între 10 și 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4	6,8	10	13
		1	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1	1,8
						1,3
						1

(*) Dintr-o coloană poate fi aleasă o serie de trei (sau mai multe) concentrații succesive. Punctele de mijloc dintre concentrațiile din coloana (x) se găsesc în coloana (2x + 1). Valorile enumerate pot să reprezinte concentrații exprimate ca procent per volum sau greutate (mg/l sau µg/l). Valorile pot fi înmulțite sau împărțite cu orice putere a lui 10, după caz. Coloana 1 poate fi folosită dacă exista o incertitudine semnificativă asupra nivelului de toxicitate.

▼**M6**

Apendicele 5

Orientări privind omogenizarea capului și a cozii la exemplarele tinere din speciile pește-zebră, *Pimephales promelas*, ghidrin și *Oryzias latipes*

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile care au loc înainte de cuantificarea concentrației VTG. Pot fi utilizate alte proceduri care conduc la cuantificarea comparabilă a VTG. Determinarea concentrației de VTG în plasma sanguină sau ficat în loc de omogenatul din cap/coadă este o opțiune.

Procedură

1. Peștii sunt anesteziați și eutanasiați conform descrierii testului.

2. Capul și coada peștelui sunt tăiate conform descrierii testului. **Important**: Toate instrumentele de disecție și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu VTG” de la femele sau de la masculii la care aceasta a fost indusă la masculii la care nu a fost indusă.

3. Greutatea ansamblului cap-coadă al fiecărui pește este măsurată la cel mai apropiat mg.

4. După cântărire, părțile sunt introduse în eprubete corespunzătoare (de exemplu, Eppendorf de 1,5 ml) și congelate la o temperatură de – 80 °C până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață și rezultatul este o masă omogenă). **Important**: *Eprubetele trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de corp corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor*.

5. Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă o cantitate de **tampon de omogenizare** (*) înghețat reprezentând de 4 – 10 ori greutatea țesutului (a se nota diluția). Se continuă operațiunea cu pistilurile până ce amestecurile devin omogene. **Notă importantă**: *Se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.*

6. Eșantioanele sunt așezate pe gheață până în momentul centrifugării la o temperatură de **4 °C** și la 50 000 g timp de 30 de minute.

7. Se utilizează o pipetă pentru a repartiza părți de 20 – 50 µl (a se nota cantitatea) de supernatant în **cel puțin două** eprubete introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără fracțiuni de grăsime sau de granule.

8. Eprubetele sunt depozitate la o temperatură de – 80 °C până în momentul utilizării.

(*) *Tampon de omogenizare:*

50 mM de Tris-HCl cu pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma): 12 ml Tris-HCl cu pH 7,4 + 120 µl amestec de inhibitori de protează (sau amestecuri de inhibitori de protează echivalente).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Amestec de inhibitori de protează: De la Sigma (pentru țesut de mamifer) Numărul produsului **P 8340**.

Notă: Tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării

▼M6

Apendicele 6

Orientări privind cuantificarea vitelogeninei din omogenatul din cap și coadă la peștele-zebră (*Danio rerio*) (modificat după Holbech et al., 2001). pot fi utilizate alte proceduri care utilizează anticorpi și standarde omoloage

1. Plăci de microtitrare (certificate Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Danemarca) acoperite în prealabil cu 5 µ g/ml IgG antilipovitelină de pește-zebră sunt decongelate și spălate de 3 ori cu tampon de spălare (*).

2. Standardul de vitelogenină de pește-zebră purificat ([1]) este diluat în serie la 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 și 20 ng/ml în tampon de diluare (**), iar eșantioanele sunt diluate de cel puțin de 200 ori (pentru a preveni efectul de matrice) în tampon de diluare și sunt aplicate pe plăci. Un control al testului este aplicat în duplicat. 150 µl se aplică în fiecare godeu. Standardele sunt aplicate în duplicat, iar eșantioanele în triplicat. Se lasă la incubat pe timpul nopții la 4 °C pe un agitator.

3. Plăcile sunt spălate de 5 ori cu tampon de spălare (*)

4. HRP cuplat la un lanț dextran (de exemplu, AMDEX A/S, Danemarca) și anticorpi conjugați se diluează în tamponul de spălare; diluarea efectivă diferă în funcție de lot și de vârstă. 150 µl se aplică în fiecare godeu, iar plăcile sunt incubate timp de 1 oră la temperatura camerei pe un agitator.

5. Plăcile sunt spălate de 5 ori cu tampon de spălare (*), iar partea de jos a plăcilor este curățată cu grijă cu etanol.

6. 150 µl TMB plus (***) se aplică în fiecare godeu. Se protejează placa împotriva luminii cu staniol și se urmărește apariția culorii pe un agitator.

7. Atunci când curba standard este pe deplin dezvoltată, activitatea enzimei este oprită prin adăugarea a 150 µl 0,2 M H_2SO_4 în fiecare godeu.

8. Absorbanța este măsurată la 450 nm (de exemplu, pe un cititor de plăci Molecular Devices Thermomax). Datele sunt analizate pe software-ul asociat (de exemplu, Softmax).

(*) Tampon de spălare:

stoc PBS (****)	500	ml
BSA	5	g
Tween 20	5	ml

Se ajustează pH-ul la 7,3 și se umple până la 5 l cu H_2O millipore. Se depozitează la 4 °C.

(**) Tampon de diluție:

Stoc PBS (****)	100	ml
BSA	3	g
Tween 20	1	ml

Se ajustează pH-ul la 7,3 și se umple până la 1 l cu H_2O millipore. Se depozitează la 4 °C.

(***) TMB plus este un substrat „gata de utilizare” produs de KemEnTec (Danemarca). Este sensibil la lumină. Se depozitează la 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), purificare conform: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

▼**M6**

(****) Stoc PBS

NaCl	160	g
KH_2PO_4	4	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4	g

Se ajustează pH-ul la 6,8 și se umple cu H_2O millipore până la 2 l. Se depozitează la temperatura camerei.

▼M6

Apendicele 7

Orientări privind pregătirea secțiunilor tisulare pentru determinarea sexului și stadializarea gonadelor

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile care au loc înainte de evaluarea secțiunilor histologice. Pot fi utilizate și alte proceduri care au ca rezultat o determinare a sexului și stadializarea gonadală similare.

Cu câteva excepții, aceste proceduri sunt similare pentru *Oryzias latipes* (*Japanese medaka* – JMD) și peștele-zebră (*zebrafish* – ZF).

Eutanasierea, necropsia și fixarea tisulară

Obiective:

1. Peștele este eutanasiat.

2. Se obține greutățile și se efectuează măsurătorile necesare.

3. Se evaluează caracteristicile sexuale secundare.

4. Țesuturile sunt disecate pentru analiza VTG.

5. Se fixează gonadele.

Proceduri:

1. Peștele trebuie sacrificat imediat înainte de necropsie. Prin urmare, cu excepția cazului în care sunt disponibile mai multe persoane pentru a efectua disecții, peștii nu trebuie să fie sacrificați simultan.

2. Folosind plase de mici dimensiuni, peștele este îndepărtat din camera experimentală și transportat în zona de necropsie în recipientul de transport.

3. Peștele este introdus în soluția de eutanasiere. Peștele este îndepărtat din soluție atunci când peștele încetează să respire și să răspundă la stimuli externi.

4. Peștele este cântărit umed.

5. Pentru pregătirea țesuturilor pentru analiza VTG, peștele poate fi plasat pe o placă de plută a unui microscop de disecție.

   a. Pentru peștele-zebră, capul este tăiat chiar în spatele înotătoarei pectorale, iar coada este tăiată chiar în spatele înotătoarei dorsale.

   b. Pentru *Oryzias latipes*, abdomenul este deschis printr-o incizie efectuată cu grijă, care se extinde de-a lungul liniei mediane ventrale de la centura pectorală la un punct situat imediat cranial față de anus. Cu ajutorul forcepsului fin și a unei foarfeci mici, ficatul este îndepărtat cu grijă.

6. Eșantionul pentru analiza VTG este plasat în tuburi Eppendorf și congelat imediat în azot lichid.

7. Carcasa care include gonadele este introdusă într-o casetă din plastic pentru țesut preetichetată, care este transferată într-un fixator Davidson sau Bouin. Volumul fixatorului trebuie să fie de cel puțin 10 de ori mai mare ca volumul aproximat al țesuturilor. Recipientul fixator este agitat ușor timp de cinci secunde pentru dislocarea bulelor de aer din casetă.

8. a. Toate țesuturile rămân în timpul nopții în fixatorul Davidson, a doua zi fiind transferate în recipiente individuale conținând formol 10 % tamponat neutru. Recipientele cu casete sunt agitate ușor timp de 5 secunde pentru a asigura penetrarea adecvată a formolului în casete.

▼M6

b. Țesuturile rămân în fixatorul Bouin timp de 24 de ore, fiind transferate în etanol 70 %.

Procesarea țesuturilor

Obiective:

1. Se deshidratează țesutul pentru penetrarea adecvată a parafinei.

2. Se impregnează țesutul cu parafină pentru a menține integritatea țesuturilor și pentru a crea o suprafață fermă pentru microtomie.

Proceduri:

3. Casetele de țesut etichetate sunt îndepărtate din mediul de stocare cu formol/etanol și sunt introduse în coșul (coșurile) de procesare. Coșul de procesare este încărcat în procesatorul tisular.

4. Se selectează calendarul de procesare.

5. După ce procesatorul tisular a finalizat ciclul de procesare, coșul (coșurile) poate (pot) fi transferat(e) în stația integrată.

Integrare

Obiectiv:

Orientarea corectă a eșantionului în parafină solidificată pentru microtomie.

Proceduri:

1. Coșul (coșurile) de casete este (sunt) îndepărtat(e) din procesator și este (sunt) scufundat(e) în camera frontală umplută cu parafină a consolei termică a stației de integrare sau casetele sunt mutate într-un încălzitor de parafină separat.

2. Prima casetă care urmează să fie integrată este îndepărtată din camera frontală a consolei termice sau din încălzitorul de parafină. Capacul casetei este îndepărtat și eliminat, iar eticheta casetei este verificată în ceea ce privește înregistrările privind animalul pentru a soluționa potențialele discrepanțe înainte de integrare.

3. Se alege o matriță de dimensiuni corespunzătoare pentru integrare.

4. Matrița este ținută sub duza consolei de distribuire și umplută cu parafină topită.

5. Eșantionul este îndepărtat din casetă și introdus în parafina topită din matriță. Aceasta operațiune se repetă cu 4 – 8 eșantioane pentru fiecare matriță cu parafină. Poziția fiecărui pește este marcată prin plasarea peștelui nr. 1 la 180 de grade față de peștii 2-4/8.

6. Se adaugă parafină suplimentară pentru a acoperi eșantionul.

7. Matrița și baza casetei se plasează pe placa de răcire a crioconsolei.

8. După ce parafina s-a solidificat, blocul (adică, parafina întărită care conține țesuturile și baza casetei) este îndepărtată din matriță

Microtomie

Obiectiv:

Se taie și se montează secțiunile histologice pentru colorare.

Proceduri:

1. Faza inițială a microtomiei, denumită „*facing*” se desfășoară astfel:

   a. Blocul de parafină este plasat în mandrina microtomului.

   b. Mandrina este avansată prin rotirea roții microtomului, iar secțiuni groase sunt tăiate de la suprafața blocului de parafină până când cuțitul ajunge la țesuturile integrate.

▼M6

c. Grosimea secțiunii pe microtom este stabilită la 3 – 5 microni. Mandrina este avansată și din bloc se taie secțiuni multiple pentru a se elimina orice artefacte create pe suprafața tăiată a țesutului în cursul tăierii grosiere.

d. Blocul poate fi îndepărtat din mandrină și plasat cu fața în jos pe gheață pentru înmuierea țesutului.

2. Următoarea fază a microtomiei este secționarea finală și montarea secțiunilor de țesut pe lame. Aceste proceduri sunt efectuate după cum urmează:

a. Dacă blocul a fost plasat pe gheață, el este îndepărtat de pe gheață și înlocuit în mandrin microtomului.

b. În condițiile în care grosimea secțiunilor de pe microtom este fixată la 3 – 5 microni, mandrina este avansată prin rotirea roții microtomului. Secțiunile sunt tăiate din bloc până când se obține o „panglică” care conțin cel puțin o secțiune acceptabilă care include gonade. (În măsura în care este necesar în timpul secționării, blocul poate fi îndepărtat din mandrină, plasat pe gheață pentru a înmuia țesutul și apoi înlocuit în mandrină.)

c. Secțiunile plutesc la suprafața apei din baia de apă. Se încearcă să se obțină cel puțin o secțiune care nu conține nici încrețituri și nici bule de aer.

d. O lamă de microscop este introdusă sub cea mai bună secțiune, care este ridicată din apă cu ajutorul lamei. Acest proces este denumit „montarea” secțiunii pe lamă.

e. Pentru un set de pești sunt pregătite trei secțiuni. A doua și a treia secțiune sunt tăiate la intervale de 50 de microni de la prima secțiune. Dacă peștele nu este integrat cu gonadele sale în același nivel de secționare, se vor realiza mai multe secțiuni pentru a se asigura că de la fiecare pește sunt obținute cel puțin șase secțiuni care să includă gonadele.

f. Cu un pix de marcare a lamei, numărul blocului din care a fost produsă lama este înregistrat pe lamă.

g. Lama este plasată pe un suport de colorare.

h. Blocul este îndepărtat din mandrină și plasat cu fața în jos pentru depozitare.

Colorarea, aplicarea lamelelor și marcarea lamelor

Obiective:

— Se colorează secțiunile pentru examenul histopatologic.

— Se sigilează permanent țesturile montate și colorate.

— Se identifică permanent secțiunile colorate într-un mod care să permită o trasabilitate completă.

Proceduri:

1. Colorare

a. Lamele se lasă să se usuce la aer peste noapte înainte de colorare.

b. Secțiunile sunt colorate cu hematoxilină-eozină.

2. Aplicarea lamelelor

a. Lamelele pot fi aplicate manual sau automat.

b. O lamă se scufundă în xilen sau în TissueClear, iar excesul de xilen/TissueClear este îndepărtat ușor de pe lamă.

▼**M6**

c. Aproximativ 0,1 ml de mediu de montare se aplică aproape de capătul lamei, opus capătului congelat sau pe lamelă.

d. Se aplică lamela pe lamă înclinând-o ușor.

3. Etichetarea

a. Eticheta de pe fiecare lamă trebuie să includă următoarele informații:

i. Denumirea laboratorului

ii. Specia

iii. Eșantion nr. / Lama nr.

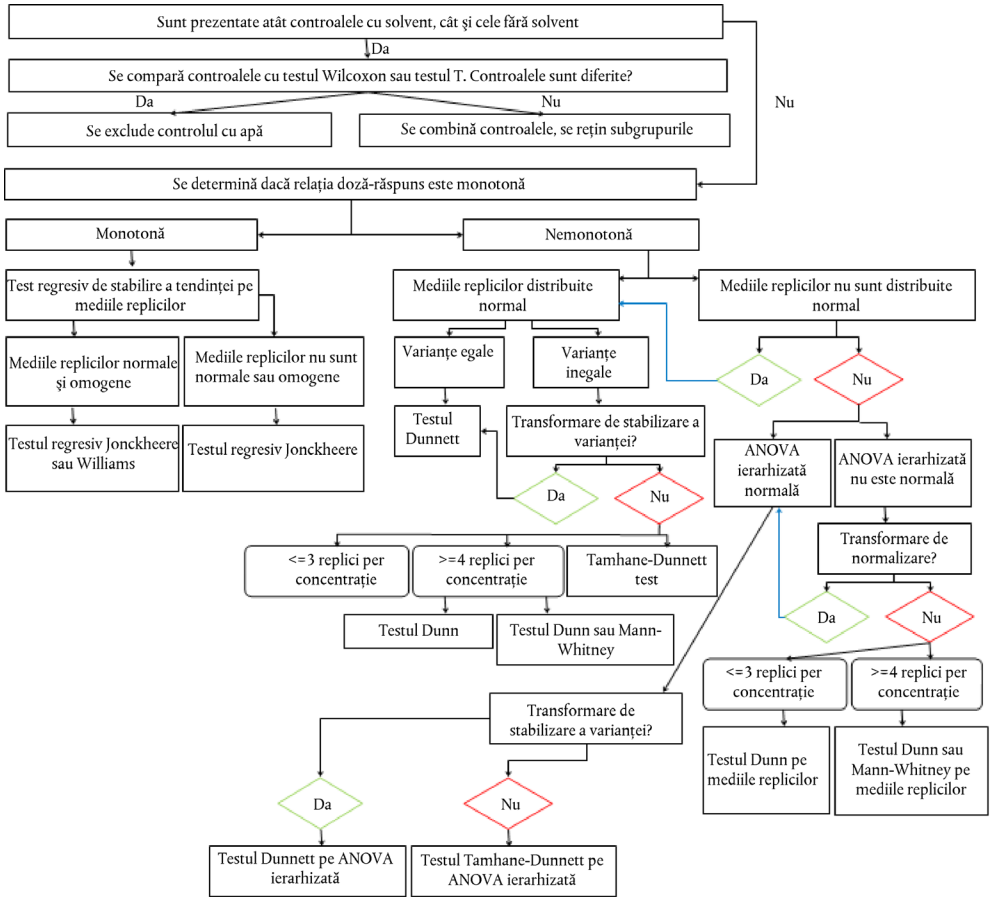
iv. Substanța chimică/grupul de tratament

v. Data

▼M6

Apendicele 8

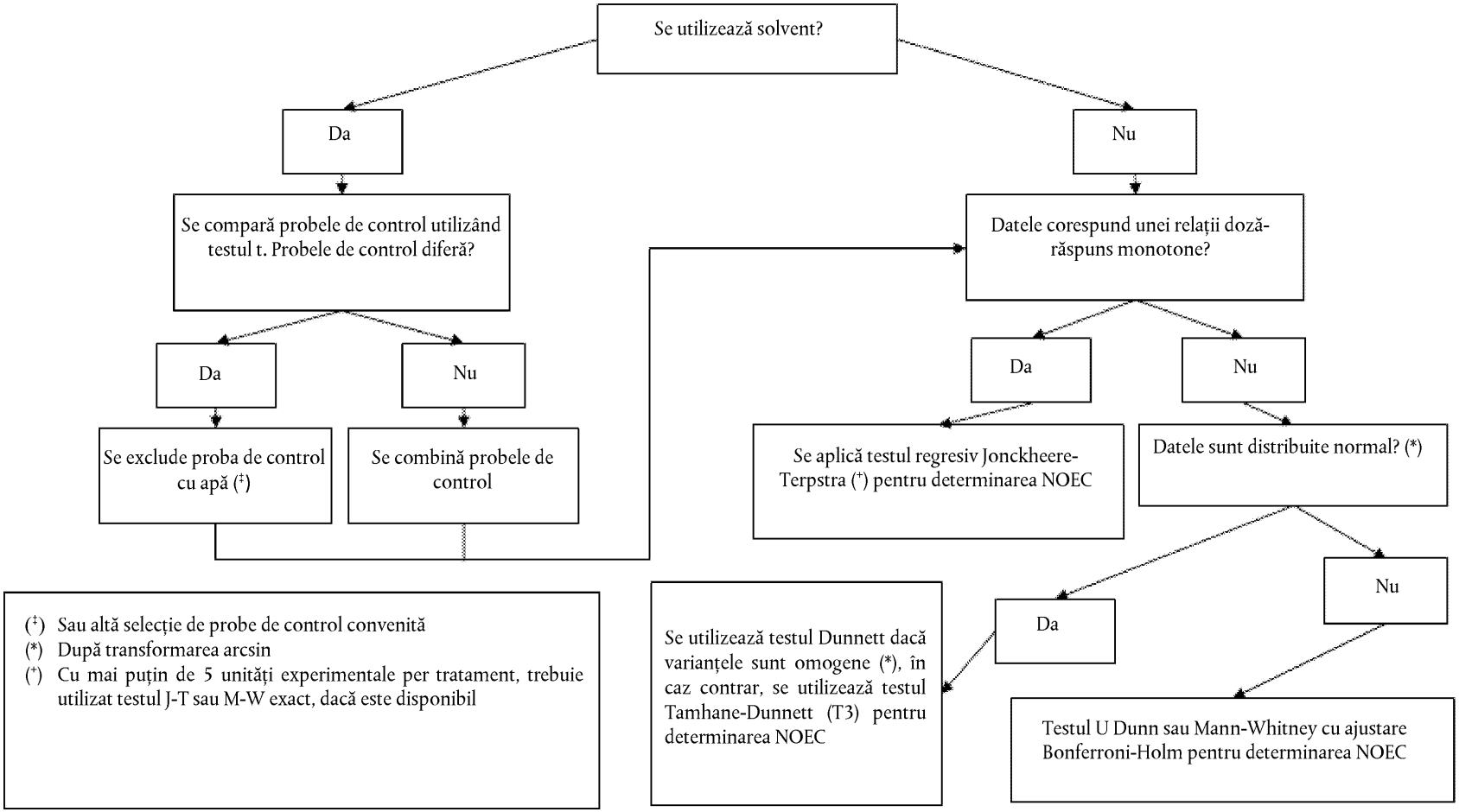
Organigramă statistică pentru analiza vitelogeninei



02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Organigramă statistică pentru analiza raportului sexelor



02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 2319

▼M6

Apendicele 9

Orientări privind prelevarea de țesut pentru determinarea sexului genetic și pentru determinarea sexului genetic prin metoda PCR

Prelevarea de țesut, pregătirea și depozitarea înainte de determinarea sexului genetic prin metoda PCR la *Oryzias latipes* (pregătită de Laboratorul pentru organisme acvatice al Bayer CropScience AG)

1. Cu ajutorul unor foarfeci fine se taie înotătoarea anală sau dorsală a fiecărui pește individual și se plasează într-o eprubetă umplută cu 100µl de tampon de extracție 1 (pentru detalii privind prepararea tamponului, a se vedea mai jos). Foarfecele vor fi curățate după fiecare pește individual într-un pahar de laborator umplut cu H_2O distilată și uscate cu un șervet de hârtie.

2. Țesuturile de la înotătoare vor fi omogenizate cu un pistil de teflon într-o microeprubetă pentru liza celulelor. Pentru fiecare eprubetă va fi utilizat un nou pistil pentru a preveni orice contaminare. Pistilurile vor fi plasate peste noapte în 0,5 M NaOH, clătite timp de 5 minute în H_2O distilată și depozitate în etanol sau în apă sterilă după autoclavare, până la utilizare.

3. De asemenea, este posibil ca țesutul de la înotătoare să fie depozitat fără ajutorul unui tampon de extracție 1 pe dioxid de carbon solid și apoi într-un congelator la o temperatură de – 80 °C pentru a preveni orice degenerare a ADN-ului. Dar extragerea se realizează mai bine dacă se extrage ADN-ul în același timp (pentru manipulare, a se vedea mai sus; eșantioanele trebuie decongelate pe gheață după depozitare – 80 °C înainte ca tamponul să fie vărsat eprubete).

4. După omogenizare, toate eprubetele vor fi plasate într-o baie de apă și se fierb timp de 15 minute la 100 °C.

5. Apoi, 100 µl din tampon de extracție 2 (pentru detalii privind prepararea tamponului, a se vedea mai jos) vor fi pipetați în fiecare eprubetă. Eșantioanele vor fi depozitate la temperatura camerei timp de 15 minute și, între timp, vor fi agitate ușor, din când în când, manual.

6. Apoi, toate eprubetele vor fi plasate din nou în baia de apă și se fierb timp de încă 15 minute la 100 °C.

7. Până la o analiză suplimentară eprubetele vor fi congelate la – 20 °C.

Prepararea tamponului

Tamponul 1 pentru PCR:

500 mg N-lauroilsarcozina (de exemplu, Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

se adaugă 100 ml apă distilată H_2O

→ autoclavare

Tamponul 2 pentru PCR:

20 g Chelex (e.g. Biorad, Munich, GE)

Se umflă în 100 ml apă distilată H_2O

→ autoclavare

Determinarea sexului genetic (prin metoda PCR) la *Oryzias latipes* (pregătită de Laboratorul pentru organisme acvatice al Bayer CropScience AG și de Universität Würzburg Biozentrum)

Eprubetele pregătite și congelate (descrise în secțiunea de mai sus) vor fi decongelată pe gheață. Apoi, ele vor fi centrifugate folosind o centrifugă Eppendorf (30 de secunde la viteză maximă, la temperatura camerei). Pentru PCR, se va folosi supernatantul clar separat de precipitat. Trebuie să se evite cu orice preț ca orice urmă de Chelex (localizată în precipitat) să fie transferată la reacția PCR, deoarece aceasta va interfera cu activitatea polimerazei „Taq”. Supernatantul va fi utilizat direct sau poate fi depozitat congelat (la – 20 °C) și redecongelat în mai multe cicluri fără un impact negativ asupra ADN-ului, pentru analize ulterioare.

▼**M6**

1. *Pregătirea „amestecului de reacție” (25 µl per eșantion):*

	Volum	Concentrație finală
Model de ADN	0,5µl – 2µl	
10 x tampon PCR cu MgCl2	2,5µl	1x
Nucleotide (fiecare dintre dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4µl (5mM)	200 µM
Primer sens (10 µM) (a se vedea mai jos 3 – 5)	0,5µl	200 nM
Primer antisens (10 µM) (a se vedea mai jos 3 – 5)	0,5µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Apă (calitate PCR)	până la 25 µl	
Polimerază Taq E	0,3 µl	1,5 U
10 x tampon PCR cu $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 la 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM MgCl2, 0,1 % Tween 20		

Pentru fiecare PCR (a se vedea mai jos 3 – 5) este necesar primerul special ca o nouă combinație de „amestec de reacție” și cantitatea adecvată necesară pentru modelul de ADN pentru fiecare eșantion (a se vedea mai sus). Volumele respective vor fi transferat în eprubete noi, folosind pipete. Ulterior, toate eprubetele vor fi închise și agitate (aproximativ 10 secunde) și centrifugate (10 secunde la temperatura camerei). Acum respectivele programe PCR pot fi pornite. În plus, un control pozitiv (eșantion de ADN exemplar cu activitate cunoscută și rezultate clare) și un control negativ (1 µl H_2O distilată) vor fi utilizate în fiecare program PCR.

2. *Prepararea gelului de agaroză (1 %) – Pe durata funcționării programelor PCR:*

— Se dizolvă 3 g agaroză în 300 ml 1 × tampon TAE (1 % gel de agaroză).

— Această soluție trebuie fiartă într-un cuptor cu microunde (aproximativ 2 – 3 minute).

— Se transferă soluția fierbinte într-o cutie specială de turnare, care este așezată pe gheață.

— După aproximativ 20 de minute, gelul de agaroză este gata de utilizare.

— Se depozitează gelul de agaroză în 1 × tampon TAE până la sfârșitul programelor PCR.

3. *Programul PCR pentru actină:*

Această reacție PCR are ca scop să demonstreze că ADN-ul din eșantion nu este deteriorat.

— Primer special:

„Mact1(sus/sens)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(jos/antisens)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (35 de ori):

Denaturare → 45 sec la 95 °C

Atașarea primerului → 45 sec la 56 °C

Elongare → 1 min la 68 °C

15 min la 68 °C

▼M6

4. Programul PCR pentru genele X și Y

Probele cu ADN intact vor fi utilizate în acest program PCR pentru a detecta genele X și Y. ADN-ul de la masculi trebuie să indice o bandă dublă, iar ADN-ul de la femele trebuie să indice o singură bandă (după colorare și electroforeză în gel). Pentru acest program trebuie inclus un control pozitiv pentru masculi (eșantion XY) și unul pentru femele (eșantion XX).

— Primer special:

„PG 17.5” (sus/sens) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6” (jos/antisens) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (40 de ori):

Denaturare	→ 45 sec la 95 °C
Atașarea primerului	→ 45 sec la 55 °C
Elongare	→ 1 min 30 sec la 68 °C

15 min la 68 °C

5. *Program PCR pentru gena Y drept „control” pentru X și program PCR pentru genele X și Y:*

Acest program PCR verifică rezultatele „programului PCR pentru genele X și Y”. „Eșantioanele-mascul” trebuie să prezinte o bandă, iar „eșantioanele-femelă” nu trebuie să prezintă nicio bandă (după colorare și electroforeză în gel).

— Primer special:

„DMTYa (sus/sens)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (jos/antisesn)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min la 95 °C

Ciclu (40 de ori):

Denaturare	→ 45 sec la 95 °C
Atașarea primerului	→ 45 sec la 56 °C
Elongare	→ 1 min la 68 °C

15 min la 68 °C

6. Colorarea eșantioanelor PCR:

Soluție pentru colorare:

50 % glicerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Albastru de bromfenol

0,25 % xilencianol

Se pipetează 1 µl de soluție de colorare în fiecare eprubetă în parte

7. Începerea electroforezei în gel:

— Gelul de agaroză 1 % preparat va fi transferat într-o cameră pentru electroforeză în gel umplută cu 1 × tampon TAE

— 10 – 15 µl din fiecare eșantion PCR colorat vor fi pipetați într-un godeu de gel de agaroză

— De asemenea, 5 – 15 µl din 1kb-„Ladder”(Invitrogen) vor fi pipetați într-un godeu separat

— Se începe electroforeza cu 200 V

— Se oprește după 30 – 45 de minute

▼**M6**

8. Determinarea benzilor:

— Se curăță gelul de agaroză în H_2O distilată

— În continuare, se transferă gelul de agaroză în bromură de etidiu timp de 15 – 30 minute

— Apoi se fotografiază gelul de agaroză într-o cutie cu UV

— În final, eșantioanele se analizează în comparație cu banda (benzile) controlului pozitiv și scara

▼M6

Apendicele 10

Orientări privind prelevarea de țesut pentru determinarea sexului genetic prin metoda PCR la ghidrin

Prelevarea de țesut și extracția ADN-ului

ADN-ul poate fi extras utilizând o varietate de reactivi disponibili comercial și sisteme manuale și automate de extracție. Protocolul utilizat în laboratorul Cefas Weymouth este indicat mai jos și au fost adăugate metode alternative acolo unde a fost cazul.

1. Cu ajutorul unor foarfece fine, se prelevă o bucată mică de țesut (10 – 20 mg) din zona dorsolaterală (după înlăturarea capului și a cozii pentru analiza VTG) de la fiecare pește. Țesutul se adaugă într-o eprubetă și fie este plasat direct în azot lichid (pentru depozitare la – 80 °C), fie umplut cu etanol 70 % (pentru transport și depozitare ulterioară la 4 °C). Foarfecele sunt curățate după fiecare pește în parte în etanol 70 %, apoi în apă distilată și se usucă cu hârtie absorbantă.

2. Etanolul (dacă este prezent) este îndepărtat prin aspirare, iar țesutul este digerat peste noapte cu proteinaza K în 400 µl de tampon ATL (Qiagen). O alicotă (200 µl) de soluție de digestie este transferată într-un bloc S cu 96 de godeuri (Qiagen), iar ADN-ul este extras într-o structură cu 96 de godeuri folosind Qiagen Universal BioRobot și kitul QIamp Investigator BioRobot. ADN-ul este eluat în 50 µl de apă fără DNază și RNază. Dacă se folosesc țesuturi dure pentru a extrage ADN-ul (precum coloana vertebrală sau o înotătoare pectorală), poate fi necesar să se omogenizeze eșantionul în tampon pentru liză cu ajutorul unui produs de liză tisulară FastPrep® sau al unui sistem echivalent de liză tisulară.

   În mod alternativ,

   (a) țesutul este digerat peste noapte cu proteinază K în 400 µl de tampon de liză G2 (Qiagen) și se extrage ADN-ul din 200 µl de țesut digerat utilizând fie kit-ul tisular ușor ADN EZ-1 și biorobotul EZ-1, fie minikit-ul tisular ușor ADN. AND-ul este eluat într-un volum de 50 µl.

   (b) Țesuturile sunt procesate utilizând reactivul DNAzol. Rezumând, eșantioanele de țesut sunt lizate în 1 ml de DNAzol timp de 10 minute într-o eprubetă de microcentrifugă de 1,5 ml și apoi centrifugate la 13 000 rpm timp de 5 minute pentru a îndepărta orice materie sub formă de particule. Eșantionul lizat este apoi transferat într-o nouă eprubetă de microcentrifugă de 1,5 ml care conține 500 µl de etanol 100 % de grad molecular și apoi centrifugat la 13 000 rpm timp de 10 minute pentru a precipita ADN-ul. Etanolul este îndepărtat și înlocuit cu 400 µl de etanol 70 % de grad molecular, centrifugat la 13 000 rpm timp de 5 minute, iar granulele de ADN sunt dizolvate în 50 µl de apă fără DNază și RNază moleculară. Din nou, atunci când se utilizează țesuturi dure (înotătoare pectorală), poate fi necesar să se omogenizeze eșantionul în tamponul pentru liză cu ajutorul unui produs de liză tisulară FastPrep® sau al unui sistem echivalent de liză tisulară înainte de extragerea ADN-ului.

3. ADN-ul se păstrează la temperatura de – 20 °C, până în momentul utilizării.*Notă importantă:* în cursul procedurilor este obligatorie purtarea mănușilor.

Testarea prin reacția în lanț a polimerazei (PCR)

Amplificările au fost efectuate utilizând 2,5 µl de extract de ADN într-un volum de reacție de 50 µl utilizând primeri de locus Idh (astfel cum a fost descris de Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Primer sens	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Primer antisens	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼**M6**

Există numeroși furnizori de reactivi PCR corespunzători. Metoda descrisă mai jos este cea utilizată în prezent în laboratorul Cefas Weymouth.

1. *Pregătirea „amestecului de reacție” (50 µl per eșantion):*

Se prepară un amestec principal după cum urmează: Acesta poate fi pregătit în prealabil și păstrat în stare congelată la – 20 °C până în momentul utilizării. Amestecul principal trebuie să fie pregătit într-o cantitate suficientă pentru un control negativ (numai apă de calitate pentru biologie moleculară).

	Volum (conc. stoc)/ eșantion	Concentrație finală
Tampon de reacție 5xGoTaq®	10µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM fiecare)	250 µM fiecare
Primer sens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2 µM
Primer antisens	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2 µM
Apă de calitate pentru biologie moleculară	30,75 µl	
Polimerază GoTaq	0,25 µl	1,25 U

— Se introduce 47,5 µl într-o eprubetă cu pereți subțiri de 0,5 ml pentru PCR.

— Se adaugă 2,5 µl de ADN purificat în eprubeta marcată corespunzător. Procedura se repetă pentru toate eșantioanele și pentru controlul negativ.

— Se adaugă deasupra 2 picături de ulei mineral. În mod alternativ, se utilizează un aparat de ciclizare termică cu capac încălzit.

— Se închid capacele.

— Eșantioanele au fost denaturate într-un aparat de ciclizare termică Peltier PTC-225 la 94 ± 2 °C timp de 5 minute, urmată de 39 de cicluri la 94 ± 2 °C timp de 1 minut, 55 ± 2 °C timp de 1 minut, 72 ± 2 °C timp de 1 minut și o extensie finală la 72 ± 2 °C timp de 10 minute.

2. *Prepararea gelului de agaroză (2 %):*

În mod tradițional, produsele PCR sunt introduse într-un gel de agaroză 20 % care conține bromură de etidiu.

Pot fi utilizate, de asemenea, sisteme de electroforeză capilare.

— Se cântăresc 2 g de agaroză în 100 ml 1 × tampon TAE

— Se încălzesc într-un cuptor cu microunde (aproximativ 2 – 3 min) pentru a dizolva agaroza.

— Se adaugă 2 picături de bromură de etidiu cu o concentrație finală de 0,5µg/ml

— Se transferă soluția fierbinte în echipamentul de formare a gelului.

— Se lasă gelul să se întărească

3. *Electroforeza în gel:*

— Gelul de agaroză este transferat în echipamentul de electroforeză și se scufundă în 1 × tampon TAE

— Se încarcă 20 µl din fiecare eșantion într-un godeu separat, adăugând un marker de greutate moleculară (scară ADN 100 bp, Promega) într-un godeu liber.

— Electroforeza se realizează la 120 V timp de 30 – 45 de minute.

▼**M6**

4. *Vizualizarea produșilor de amplificare*

Dacă bromura de etidiu a fost încorporată în gelul de agaroză astfel cum se descrie mai sus, produșii ADN sunt vizualizați cu o sursă de raze UV. Ca alternativă, gelul de agaroză este colorat prin acoperirea gelului cu soluție diluată de bromură de etidiu (0,5 μg/ml în apă) timp de 30 de minute înainte de vizualizare.

▼M6

Apendicele 11

Orientări pentru procedura de fertilizare artificială a de ghidrinilor

Scopul acestei secțiuni este de a descrie procedurile de obținere a ouălor fertilizate de ghidrin în vederea utilizării lor în FSDT.

Proceduri

Obținerea spermei de la masculi

1. Un mascul bine colorat din populația dorită este eutanasiat.

2. Testiculele sunt disecate de pe fiecare latură a peștelui. *Testiculele sunt în general structuri intens pigmentate, sub formă bastoane, care sunt ușor vizibile lateral de linia mediană a corpului*. Se utilizează una dintre următoarele metode:

3. Utilizând o pereche de foarfeci fine, se începe de la cloacă și se realizează o incizie de 1 – 1,5 cm într-o singură mișcare sub un unghi de circa 45 de grade.

4. Se folosește un bisturiu pentru realizarea unei incizii mici în părțile laterale ale peștelui ușor posterior față de pelvis și imediat ventral față de plăcile laterale.

5. Testiculele sunt îndepărtate utilizând un forceps fin și sunt plasate într-o placă Petri.

6. Fiecare testicul este acoperit cu 100 µl de **soluție finală Hank** ([1]) proaspăt preparată.

7. Testiculele sunt tăiate mărunt folosind o lamă de oțel sau un bisturiu. Aceasta va elibera sperma și va conferi soluției Hank un aspect lăptos.

8. Fluidul conținând spermă se adaugă într-o pipetă, încercând, în același timp, să nu se includă bucăți de țesut de testicule atunci când se pipetează.

9. 800 µl de soluție finală Hank se adaugă într-o eprubetă și se amestecă bine.

10. Dacă este necesar, masculii pot fi conservați prin fixare în etanol 100 % sau în alt fixator dorit. Aceasta este deosebit de important în cazul în care studiul atribuie originea parentală a descendenților.

Notă importantă: *Cu toate că majoritatea soluțiilor stoc necesare pot fi efectuate în avans,* ***soluția stoc 5*** *și, ulterior, soluția finală, trebuie constituite în stare* ***proaspătă*** *în ziua utilizării.*

Soluția stoc 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Apă distilată (*Distilled water* – DW)	100 ml

Soluția stoc 2

Na_2HPO_4 (anhidru)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
DW	100 ml

Soluția stoc 3

$CaCl_2$	0,72 g
DW	50 ml

([1]) Soluție salină tamponată Hank (*Hank's Buffered Salt Solution* – HBSS):
HBSS este necesară pentru a păstra sperma în cursul pregătirii pentru fertilizare.

▼**M6**

Soluția stoc 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
DW	50 ml

Soluția stoc 5 (proaspăt preparată)

$NaHCO_3$	0,35 g
DW	10 ml

Notă: Dacă există disponibile unele dintre sărurile de mai sus dar cu conținut de apă diferit (i.e. $2H_2O$ în loc de anhidre) ele pot fi utilizate, dar mai întâi se ajustează greutatea pe baza greutății moleculare).

Pentru soluția finală Hank se combină în următoarea ordine:

soluția stoc 1	1 ml
soluția stoc 2	0,1 ml
soluția stoc 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
soluția stoc 4	0,1 ml
soluția stoc 5	0,1 ml

Se amestecă bine înainte de utilizare.

Fertilizare

1. Se identifică femele mari, gestante, din populația dorită; femelele sunt gata de presare numai atunci când se pot vedea ouăle ieșind din cloacă. Femelele pregătite au o postură caracteristică cu capul în sus.

2. Se presează ușor cu un deget pe partea laterală a peștelui în direcția spre coadă pentru a stimula expulzarea ouălor într-un vas Petri proaspăt. Acțiunea se repetă pe cealaltă parte, apoi peștele este întors în bazin.

3. Ouăle pot fi răspândite (formând un monostrat) cu ajutorul unei pensule fine. Este important să se încerce expunerea a cât mai multor ouă la spermă maximalizând astfel aria suprafeței ouălor. Notă importantă: Ouăle se mențin umede prin plasarea unui șervet umed în jurul lor (este important ca ouăle să nu intre în contact direct cu apa pentru că acest lucru poate întări prematur corionul, împiedicând fertilizarea). Există o mare variație a numărului de ouă produse de fiecare femelă, dar ca o medie, ar trebui să se obțină cu ușurință aproximativ 150 de ouă de la o singură femelă gestantă.

4. 25µl de spermă în amestecul Hank se aplică în mod uniform pe întreaga suprafață a ouălor cu ajutorul unei pensule. Ouăle se vor întări rapid și își vor schimba culoarea (într-un minut) odată cu începerea fertilizării. Dacă numărul estimat de ouă este mai mare de 150 procedura se repetă. În mod similar, dacă ouăle nu se întăresc într-un minut se mai adaugă spermă. Notă importantă: Adăugarea de spermă suplimentară nu îmbunătățește neapărat rata de fertilizare.

5. Ouăle și soluția de spermă trebuie lăsate să „interacționeze” timp de minimum 15 minute, iar ouăle fertilizate trebuie introduse în acvariile de expunere după 1,5 ore de la fertilizare.

6. Procedura se repetă utilizând o altă femelă până se colectează numărul dorit de ouă.

7. Se păstrează câteva ouă din ultimul lot și se fixează în acid acetic 10 %.

▼M6

Numărarea și distribuirea ouălor în acvariile de testare

1. Ouăle trebuie să fie distribuite în mod uniform între fiecare nivel de tratament pentru evitarea rezultatelor incorecte din cauze genetice. Fiecare lot de ouă fertilizate trebuie separat în grupe de mărimi egale (număr egal cu nivelurile de tratament) folosind un instrument neascuțit (forceps entomologic cu lame late sau o ansă de inoculare). În cazul în care se vizează 4 replici per tratament, fiecare cu 20 de ouă, trebuie să se distribuie 80 ouă per acvariu de expunere. Notă importantă: Este recomandabil să se adauge un supliment de 20 % (adică 96 de ouă per nivel de tratament) până când este sigur că se obțin rate de fertilizare de 100 %.

2. Ouăle de ghidrin sunt foarte predispuse la infecții micotice în afara cuibului păzit de tată. În această privință, tratarea tuturor ouălor cu albastru de metilen în primele 5 de zile ale testului are o importanță capitală. O soluție stoc de albastru de metilen este preparată la concentrația de 1 mg/ml și este adăugată în acvariile de expunere pentru a se obține o concentrație finală maximă de 2,125 mg/l. Notă importantă: Ghidrinii nu trebuie să fie expuși la albastru de metilen odată eclozați, astfel încât sistemul trebuie să fie lipsit de albastru de metilen până în ziua 6.

3. Ouăle se inspectează în fiecare zi și orice ouă moarte sau nefertilizate sunt înregistrate ca atare. Notă importantă: Ouăle nu trebuie să ajungă niciodată în afara apei până când eclozează, chiar și pentru perioade foarte scurte.

▼M6

C.42. BIODEGRADABILITATEA ÎN APĂ DE MARE

INTRODUCEREA GENERALĂ

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 306 (1992). Atunci când au fost elaborate metodele de testare originale, nu se știa în ce măsură rezultatele testelor de screening pentru ușurința biodegradabilității, utilizând apă dulce cu inocul de apă de canal sau nămol activat, ar putea fi aplicate mediului marin. Cu privire la acest subiect au fost raportate rezultate variabile [de exemplu (1)].

2. Multe ape reziduale industriale, care conțin o varietate de substanțe chimice, ajung în mare fie prin descărcare directă, fie prin intermediul unor estuare și râuri în care timpii de staționare sunt mici în comparație cu perioada necesară pentru biodegradarea completă a multora dintre substanțele chimice prezente. Având în vedere conștientizarea crescândă a nevoii de a proteja mediul marin împotriva unor cantități din ce în ce mai mari de substanțe chimice și necesitatea de a estima concentrația probabilă a substanțelor chimice în mare, au fost elaborate metode de testare a biodegradabilității în apa de mare.

3. Metodele descrise aici folosesc apă de mare naturală atât ca fază apoasă, cât și ca sursă de microorganisme. În încercarea de a respecta metodele privind ușurința biodegradabilității în apă dulce, a fost investigată utilizarea apei de mare ultrafiltrate și centrifugate și a sedimentelor marine ca inocul. Aceste investigații au fost lipsite de succes. Prin urmare, mediul de testare este apa de mare naturală pretratată pentru îndepărtarea particulelor grosiere.

4. Pentru a evalua biodegradabilitatea completă prin metoda agitării flaconului, trebuie să fie utilizate concentrații relativ mari ale substanței testate din cauza sensibilității mici a metodei analitice de determinare a carbonului organic dizolvat (*dissolved organic carbon* – DOC). Acesta, necesită în schimb adăugarea la apa de mare a unor nutrienți minerali (N și P), ale căror concentrații mici ar limita înlăturarea DOC. În metoda cu flaconul închis este de asemenea necesar să se adauge nutrienți din cauza concentrației substanței testate adăugate.

5. Prin urmare, metodele nu sunt teste pentru ușurința biodegradabilității deoarece nu se adaugă inocul în plus față de microorganismele deja prezente în apa de mare. Teste nici nu simulează mediului marin, întrucât se adaugă nutrienți, iar concentrația substanței testate este mult mai mare decât ar fi prezentă în mare. Din aceste motive, metodele sunt propuse în cadrul unei noi secțiuni, „Biodegradabilitatea în apă de mare”.

APLICARE

6. Rezultatele testelor, care ar fi aplicate deoarece modelul de utilizare și de eliminare a substanței în cauză indică o cale către mare, oferă o primă impresie asupra biodegradabilității în apa de mare. Dacă rezultatul este pozitiv (îndepărtare > 70 % DOC; > 60 % ThOD – *theoretical oxygen demand*), se poate concluziona că există un potențial pentru biodegradare în mediul marin. Cu toate acestea, un rezultat negativ nu exclude un astfel de potențial, însă indică faptul că este necesar un studiu suplimentar, de exemplu, utilizând o concentrației a substanței testate cât mai mică.

▼M6

7. În orice caz, dacă o valoare mai definitivă pentru rata sau gradul de biodegradare în apa de mare într-un anumit loc este necesară, trebuie aplicate alte metode mai complexe și mai sofisticate și, prin urmare, mai costisitoare. De exemplu, ar putea fi aplicat un teste de simulare folosind o concentrație a substanței testate mai apropiată de concentrația din mediu probabilă. De asemenea, apa de mare nefortificată și nepretratată prelevată din locația de interes ar putea fi utilizată, iar biodegradarea primară ar putea fi urmată de analiza chimică specifică. Pentru biodegradabilitatea completă, ar fi necesare substanțe marcate cu ^{14}C pentru a se putea măsura la concentrații care reflectă realist concentrațiile din mediu ratele dispariției ^{14}C organic solubil și producția de $^{14}CO_2$.

ALEGEREA METODELOR

8. Selectarea metodei de utilizat depinde de o serie de factori; tabelul următor ajută la procesul de selecție. În timp ce substanțele cu solubilitate în apă sub echivalentul de 5 mg C/l nu pot fi testate prin metoda agitării flaconului, cel puțin, în principiu, substanțele puțin solubile în apă pot fi testate prin metoda de testare cu flacon închis.

Tabel

Avantajele și dezavantajele testării prin metoda agitării flaconului și a flaconului închis

METODĂ	AVANTAJE	DEZAVANTAJE
AGITAREA FLACONULUI	— aparatură simplă cu excepția analizorului C — o durată de 60 de zile nu constituie o problemă — fără interferență din partea nitrificării — poate fi adaptată pentru substanțe volatile	— necesită analizorul C — utilizează 5 – 40 mg DOC/1, poate avea efect inhibitor — determinarea DOC este dificilă la concentrații mici în apa de mare (efect al clorurilor) — uneori DOC este mai mare în apa de mare
FLACON ÎNCHIS	— aparatură simplă — determinare finală simplă — utilizează concentrație mică de substanță testată (2 mg/l), prin urmare, șanse mai mici de inhibiție — poate fi adaptată cu ușurință pentru substanțe volatile	— poate fi dificil de menținut etanșeitatea flacoanelor — creșterea de bacterii pe peretele flaconului poate conduce la valori false — valorile absorției de O_2 în martor pot fi mari în special după 28 de zile; ar putea fi eliminate prin învechirea apei de mare — posibilă interferență cu absorția de O_2 prin nitrificare

METODA AGITĂRII FLACONULUI

INTRODUCERE

1. Această metodă este o variantă cu apă de mare a Testului de screening modificat al OCDE descris în capitolul C.4B din prezenta anexă (2). A fost finalizată în urma unui test interlaboratoare organizat pentru Comisia Europeană (CE) de Institutul danez pentru calitatea apei (3).

2. La fel ca în cazul metodei de testare cu flacon închis utilizând apă de mare, rezultatele acestui test nu trebuie să fie considerate drept indicatori ai ușurinței biodegradabilității, însă trebuie să fie utilizate pentru a obține informații privind biodegradabilitatea substanțelor în mediile marine.

▼M6

PRINCIPIUL METODEI

3. O cantitate predeterminată de substanță testată este dizolvată în mediul de testare pentru a se obține o concentrație de 5 – 40 mg de carbon organic dizolvat (DOC)/l. Dacă limitele sensibilității analizelor carbonului organic sunt îmbunătățite, poate fi avantajoasă utilizarea de concentrații mai mici ale substanței testate, în special pentru substanțele inhibitoare. Soluția substanței testate în mediul de testare este incubată în condiții aerobe cu agitare la întuneric sau la lumină difuză și la o temperatură fixă controlată (controlată la ± 2 °C) care în mod normal variază între 15 și 20 °C. În cazurile în care obiectivul studiului este acela de a simula condițiile de mediu, testele pot fi efectuate în afara acestui interval normal de temperatură. Durata testului maximă recomandată este de aproximativ 60 de zile. Degradarea este urmată de măsurători ale DOC (degradare completă) și, în unele cazuri, prin analize specifice (degradare primară).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

4. Pentru a ști dacă testul poate fi aplicat unei anumite substanțe, trebuie să fie cunoscute anumite proprietăți ale acesteia. Trebuie stabilit conținutul de carbon organic din substanță, volatilitatea acesteia trebuie să fie astfel încât nu existe pierderi semnificative pe durata testului, iar solubilitatea ei în apă trebuie să fie mai mare decât echivalentul a 25 – 40 mg C/l. În plus, substanța testată nu trebuie să se absoarbă în mod semnificativ pe suprafața sticlei. Sunt necesare informații privind puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale substanței testate pentru ca rezultatele obținute să poată fi interpretate, în special atunci când rezultatul se situează aproape de nivelul de „trecere”.

5. Informațiile privind toxicitatea substanței testate pentru bacterii, de exemplu astfel cum este măsurată în testele ratei respirației pe termen scurt (4), pot fi utile atunci când sunt selectate concentrațiile de testare corespunzătoare și pot fi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor mici ale biodegradării. Cu toate acestea, astfel de informații nu sunt întotdeauna suficiente pentru interpretarea rezultatelor obținute în testarea biodegradării, iar procedura descrisă la punctul 18 este mai adecvată.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

6. Trebuie utilizate substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea microbiană a eșantionului de apă de mare. Benzoatul de sodiu, acetatul de sodiu și anilina sunt exemple de substanțe care pot fi utilizate în acest scop. Substanțele de referință trebuie să se degradeze într-un interval de timp rezonabil de scurt, altfel se recomandă repetarea testului folosind un alt eșantion de apă de mare.

7. În testul interlaboratoare organizat de CE, în care eșantioanele de apă de mare au fost prelevate din diferite locații și în diferite momente din cursul unui an (3), faza de latență (t_L) și timpul necesar obținerii unei degradări de 50 % (t_{50}), cu excepția fazei de latență, au fost de 1 – 4 zile și, respectiv, de 1 – 7 zile pentru benzoatul de sodiu. În ceea ce privește anilina, t_L a variat între 0 și 10 zile, în timp ce t_{50} a variat între 1 și 10 zile.

REPRODUCTIBILITATEA ȘI SENSIBILITATEA METODEI

8. Reproductibilitatea metodei a fost stabilită în urma testului interlaboratoare (3). Cea mai mică concentrație a substanței testate, pentru care această metodă poate fi utilizată cu analiza DOC, este determinată în mare măsură prin limita de detectare a analizei carbonului organic (aproximativ 0,5 mg C/l, în prezent) și prin concentrația de carbon organic dizolvat în apa de mare utilizată (în general de ordinul a 3 – 5 mg/l pentru apa de mare din larg). Concentrația de fond a DOC nu trebuie să depășească în jur de

▼M6

20 % din concentrația DOC total după adăugarea substanței testate. Dacă nu este fezabil, concentrația de fond a DOC poate fi redusă uneori prin învechirea apei de mare înainte de testare. Dacă metoda este folosită numai cu analiza chimică specifică (prin care se măsoară degradarea primară), investigatorul trebuie să documenteze, prin furnizarea de informații suplimentare, dacă se poate preconiza o degradare completă. Informațiile suplimentare pot consta în rezultatele obținute în urma altor teste privind biodegradabilitatea cu ușurință sau inerentă.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

9. Aparatură obișnuită de laborator și:

a. Dispozitiv de agitare care să poată conține flacoane Erlenmeyer de 0,5 – 2 litri, fie cu control automat al temperaturii, fie utilizat într-o cameră cu o temperatură constantă de 15 – 20 °C controlată la ± 2 °C;

b. Flacoane Erlenmeyer de 0,5 – 2 litri cu gâtul îngust;

c. Dispozitive de filtrare cu membrană, sau centrifuge;

d. Filtre cu membrană, 0,2 – 0,45 μm;

e. Analizor de carbon;

f. Echipamente pentru analize specifice (opțional).

Apa de mare

10. Se prelevează un eșantion de apă de mare într-un recipient curățat cu atenție și se transportă la laborator, de preferință în termen de o zi sau două de la prelevare. Pe durata transportului, temperatura eșantionului nu trebuie lăsată să depășească semnificativ temperatura care urmează să fie utilizată în test. Se identifică cu precizie locația de unde a fost prelevat eșantionul și se descrie situația poluării și nutrienților. În special pentru apele de coastă, această caracterizare trebuie să includă numărul coloniilor microbiene heterotrofe și determinarea concentrațiilor azotatului, amoniacului și fosfatului dizolvați.

11. Se furnizează următoarele informații pentru eșantionul de apă de mare:

— data prelevării;

— adâncimea de prelevare;

— aspectul eșantionului – tulbure etc.;

— temperatura la momentul prelevării;

— salinitatea;

— DOC;

— intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test.

12. În cazul în care conținutul de DOC din eșantionul cu apă de mare este mare (punctul 8), se recomandă ca apa de mare să fie învechită timp de aproximativ o săptămână înainte de utilizare. Învechirea se realizează prin depozitare în condiții aerobe la temperatura de testare la întuneric sau la lumină

▼M6

difuză. Dacă este necesar, condițiile aerobe sunt menținute prin aerare ușoară. Pe durata învechirii, conținutul materialului organic ușor degradabil este redus. În testul interlaboratoare (3), nu au fost observate diferențe între potențialele de degradare ale eșantioanelor de apă de mare învechită sau recent prelevate. Înainte de utilizare, apa de mare se tratează în prealabil pentru a îndepărta particulele mari, de exemplu prin filtrarea cu ajutorul unui filtru din nailon sau al unui filtru de hârtie cu porozitate mare (fără membrană sau filtre GF-C) sau prin sedimentare și decantare. Procedura utilizată trebuie raportată. Pretratamentul se efectuează după învechire, dacă se utilizează.

Soluții stoc pentru nutrienți minerali

13. Se prepară următoarele soluții stoc folosind reactivi de puritate analitică:

(a)	Ortofosfat diacid monopotasic, KH_2PO_4	8,5 g
	Ortofosfat acid dipotasic, K_2HPO4	21,75 g
	Ortofosfat acid disodic dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,3 g
	Clorură de amoniu, NH_4Cl	0,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(b)	Clorură de calciu, $CaCl_2$	27,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(c)	Sulfat de magneziu heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(d)	Clorură de fier (III) hexahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	

Precipitarea în soluție (d) poate fi prevenită prin adăugarea unei picături de HCl concentrat sau a 0,4 g de acid etilendiaminotetraacetic (EDTA, sare disodică) per litru. Dacă se formează un precipitat într-o soluție stoc, aceasta trebuie înlocuită cu o soluție nou preparată.

Pregătirea mediului de testare

14. Se adaugă 1 ml din fiecare soluție stoc menționată mai sus per litru de apă de mare pretatată.

Inoculul

15. Nu se adaugă un inocul specific în plus față de microorganismele care sunt deja prezente în apa de mare. Se determină (opțional) numărul de heterotrofe care formează colonii în mediul de testare cu apă de mare (și, de preferință, și în eșantioanele de apă de mare originale), de exemplu, prin numărarea pe placă, utilizând agar marin. Acest lucru este de dorit în special pentru eșantioanele prelevate din locații costiere sau poluate. Se verifică activitatea microbiană heterotrofă în apa de mare prin realizarea unui test cu o substanță de referință.

▼M6

Pregătirea flacoanelor

16. Se asigură că toate vasele din sticlă sunt curățate foarte atent, nu trebuie să fie neapărat sterile (de exemplu, folosind acid clorhidric alcoolic), se clătesc și se usucă înainte de utilizare pentru a evita contaminarea cu reziduuri rezultate din teste anterioare. Flacoanele trebuie, de asemenea, să fie curățate înainte de prima utilizare.

17. Se evaluează substanțele testate în flacoane duplicat simultan, împreună cu un singur flacon pentru substanța de referință. Se realizează un test martor, în duplicat, fără substanța testată sau de referință, pentru determinarea valorilor analitice ale martorului. Se dizolvă substanțele testate în mediul de testare – ele pot să fie adăugate în mod convenabil prin intermediul unei soluții stoc concentrate – pentru a asigura concentrațiile inițiale dorite, în mod normal de 5 – 40 mg DOC/l. Se testează substanța de referință, în mod normal la o concentrație inițială corespunzătoare de 20 mg DOC/l. În cazul în care sunt utilizate soluții stoc ale substanței testate și/sau de referință, se asigură faptul că salinitatea mediului de apă de mare nu este modificat în mod semnificativ.

18. În cazul în care sunt estimate efecte toxice sau dacă acestea nu pot fi excluse, se recomandă includerea unui experiment privind inhibarea, în duplicat, în protocolul de testare. Se adaugă substanțele testată și de referință în același vas, concentrația substanței de referință fiind, în mod normal, aceeași cu cea din testul de control (și anume 20 mg DOC/l) pentru a permite de comparațiile.

19. Se varsă cantități adecvate de soluții de testare în flacoanele Erlenmeyer (până la aproximativ jumătatea volumului, ceea ce reprezintă o cantitate convenabilă) și apoi se acoperă fiecare flacon în mod neermetic (folie de aluminiu) pentru a permite schimbul gazos dintre flacon și aerul ambiental. (În cazul în care se utilizează analiza DOC, dopurile de vată nu sunt adecvate). Vasele se plasează pe agitator și se agită în mod continuu cu viteză redusă (de exemplu, 100 rpm) pe durata testului. Se controlează temperatură (15 – 20 °C și în intervalul ± 2 °C) și se protejează vasele de lumină pentru a evita creșterea de alge. Se asigură că aerul nu conține materiale toxice.

Test fizico-chimic de control (opțional)

20. Dacă se suspectează degradarea abiotică sau mecanisme de pierdere, precum hidroliza (problemă care apare numai în cazul unei analize specifice), volatilizarea sau absorbția, se recomandă efectuarea unui test de control fizico-chimic. Acesta poate fi realizat prin adăugarea de clorură de mercur (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50 – 100 mg/l) în vase cu substanțe testată pentru a opri activitatea microbiană. O scădere semnificativă a DOC sau a concentrației substanței specifice în testul de control fizico-chimic indică prezența unor mecanisme de îndepărtare abiotice. (Dacă se utilizează clorură de mercur, trebuie să se acorde atenție interferențelor sau dezactivării catalizatorului în analiza DOC).

Numărul de flacoane

21. Într-un test tipic sunt folosite următoarele flacoane:

Flacoanele 1 & 2 – care conțin substanța testată (suspensia de testare);

Flacoanele 3 & 4 – care conțin numai apă de mare (martor);

Flaconul 5 – care conține substanța de referință (control procedură);

Flaconul 6 – care conține substanța testată și de referință (control toxicitate) – opțional;

Flaconul 7 – care conține substanța testată și agentul de sterilizare (control steril abiotic) – opțional.

([1]) Clorura de mercur (II) ($HgCl_2$) este o substanță foarte toxică care trebuie manipulată luând măsuri de precauție adecvate.. Deșeurile apoase care conțin această substanță trebuie evacuate în mod corespunzător; ele nu trebuie să fie eliminate în sistemul pentru ape reziduale.

▼M6

Analiza DOC

22. Pe parcursul testului, eșantioanele se extrag la intervale adecvate pentru analiza DOC (apendicele 1). Eșantioanele se prelevează întotdeauna la începutul testului (ziua 0) și în ziua 60. Cel puțin cinci eșantioane în total sunt necesare pentru a descrie evoluția în timp a degradării. Nu se poate indica un calendar fix pentru eșantionare întrucât viteza de biodegradare variază. Se determină DOC în duplicat pentru fiecare eșantion.

Eșantionarea

23. Volumul necesar de eșantioane depinde de metoda de analiză (analiză specifică), de analizorul de carbon utilizat și de procedura (filtrarea cu membrană sau centrifugarea) selectată pentru tratamentul eșantionului înainte de determinarea carbonului (punctele 25 și 26). Înainte de eșantionare, trebuie să se asigure că mediul de testare este bine amestecat și că orice material aderent pe peretele flaconului este dizolvat sau suspendat.

24. Se filtrează cu membrană sau se centrifughează imediat după eșantionare. Dacă este necesar, eșantioanele filtrate sau centrifugate se depozitează la 2 – 4 °C timp de 48 de ore sau sub – 18 °C pentru perioade de timp mai lungi (dacă se cunoaște faptul că substanța va rămâne neafectată, se acidifiază la pH 2 înainte de depozitare).

25. Filtrele cu membrană (0,2 – 0,45 μm) sunt adecvate dacă se asigură că acestea nu eliberează carbon și nu absorb substanța în etapa de filtrare, de exemplu, filtre cu membrană din policarbonat. Anumite filtre cu membrană sunt impregnate cu agenți tensioactivi pentru hidrofilizare și pot elibera cantități considerabile de carbon dizolvat. Aceste filtre se pregătesc prin fierberea în apă deionizată pe parcursul a trei perioade consecutive, fiecare cu durata de o oră. După fierbere, filtrele se depozitează în apă deionizată. Primii 20 ml de filtrat se elimină.

26. Centrifugarea eșantioanelor poate fi aleasă ca alternativă la filtrarea cu membrană. Se realizează centrifugarea la 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) timp de 15 minute, de preferință într-o centrifugă frigorifică.

Notă: Diferențierea dintre carbonul organic total (*Total Organic Carbon* – TOC) și DOC (TOC/DOC) prin centrifugare la concentrații foarte mici nu pare să funcționeze, deoarece fie nu au fost îndepărtate toate bacteriile, fie carbonul, ca parte a plasmei bacteriene, este redizolvat. La concentrații mai mari (> 10 mg C per litru), eroarea în urma centrifugării pare a fi comparativ mică.

Frecvența eșantionării

27. Dacă analizele sunt efectuate imediat după eșantionare, se evaluează următorul moment de eșantionare, luând în considerare rezultatul determinării analitice.

28. Dacă eșantioanele sunt conservate (punctul 24) pentru o analiză ulterioară, trebuie prelevate mai multe eșantioane decât numărul minim de cinci. Se analizează mai întâi ultimele eșantioane prelevate și, printr-o selecție pas cu pas „inversă” a eșantioanelor adecvate pentru analiză, este posibilă obținerea unei bune descrieri a curbei de biodegradare cu un număr relativ mic de determinări analitice. În cazul în care până la sfârșitul testului nu există degradare, nu mai este necesară analiza de eșantioane suplimentare, și în această situație, strategia „inversă” poate asigura economisirea unei părți considerabile a costurilor analitice.

▼M6

29. Dacă se observă un platou al curbei de degradare înainte de ziua 60, se încheie testul. Dacă degradarea a început în mod evident înainte de ziua 60, dar nu a atins un platou, experimentul se prelungește pentru o perioadă suplimentară.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

30. Se înregistrează rezultatele analitice pe fișa de date anexată (apendicele 2) și se calculează valorile biodegradării pentru substanțele testată și de referință pe baza ecuației:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

unde:

D_t = degradarea în procent de îndepărtare a DOC sau a substanței specifice în momentul t;

C_o = concentrația inițială a DOC sau a substanței specifice în mediul de testare;

C_t = concentrația DOC sau a substanței specifice în mediul de testare la momentul t,

$C_{bl(0)}$ = concentrația inițială a DOC sau a substanței specifice în martor,

$C_{bl(t)}$ = concentrația DOC sau a substanței specifice în martor la momentul t;

31. Se indică degradarea sub formă de procent al îndepărtării DOC (degradare completă) sau a substanței specifice (degradare primară) la momentul t. Concentrațiile DOC se calculează cu rotunjire la cea mai apropiată zecime de mg/l și se rotunjesc valorile medii ale D_t la cel mai apropiat procent întreg.

32. Se ilustrează în mod grafic curba de degradare într-o diagramă astfel cum se indică în figura „Validitatea și interpretarea rezultatelor". Dacă există suficiente date, pornind de la această curbă, se calculează faza de latență t_L) și timpul necesar pentru a obține îndepărtarea în proporție de 50 % după încheierea fazei de latență (t_{50}).

Raportul privind testul

33. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța testată:

— natura fizică și, dacă este relevant, proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare.

Condiții de testare:

— locul prelevării de eșantioane și descrierea sa; situația poluării și a nutrienților (numărul coloniilor, azotat, amoniu, fosfat, dacă este cazul);

— caracteristicile eșantionului [data eșantionării, adâncimea, aspectul, temperatura, salinitatea, DOC (opțional), intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test];

▼**M6**

— metoda utilizată (dacă este cazul) pentru învechirea apei de mare;

— metoda utilizată pentru pretratarea (filtrare/sedimentare) apei de mare;

— metoda utilizată pentru determinarea DOC;

— metoda utilizată pentru analize specifice (opțional);

— metoda utilizată pentru determinarea numărului de heterotrofe în apa de mare (metoda de numărare pe placă sau o procedură alternativă) (opțional);

— alte metode (opțional) utilizate pentru caracterizarea apei de mare (măsurători ale ATP etc.).

Rezultate:

— datele analitice raportate într-o fișă de date (apendicele 2);

— evoluția testului de degradare este reprezentată grafic într-o diagramă indicând faza de latență (t_L), panta și timpul (începând cu sfârșitul fazei de latență) de obținere a îndepărtării în proporție de 50 % (t_{50}). Faza de latență poate fi estimată grafic astfel cum se indică în figura din secțiunea „Validitatea și interpretarea rezultatelor” sau considerată în mod convenabil ca timpul necesar pentru o degradare de 10 %;

— procentul de degradare măsurat după 60 de zile sau la sfârșitul testului.

Discutarea rezultatelor.

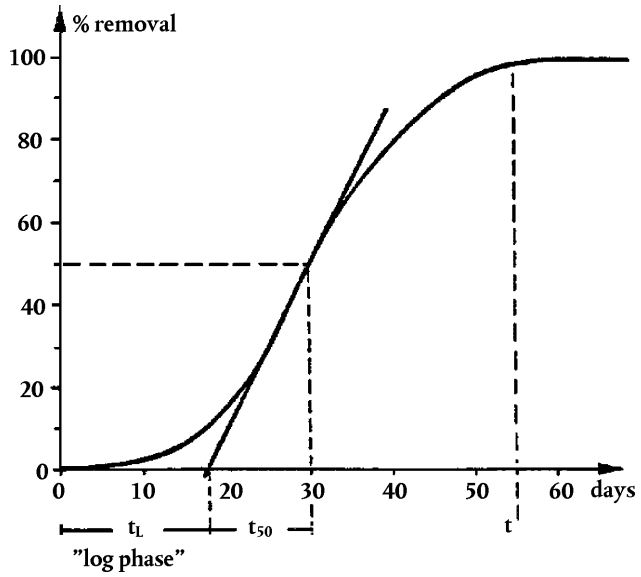
Validitatea și interpretarea rezultatelor

34. Rezultatele obținute cu substanțele de referință, de exemplu benzoatul de sodiu, acetatul de sodiu sau anilina, trebuie să fie comparabile cu rezultatele obținute în testul interlaboratoare (3) (a se consulta secțiunea „Substanțe de referință”, punctul 7). Dacă rezultatele obținute cu substanțele de referință sunt atipice, testul trebuie repetat folosind alt eșantion de apă de mare. Deși rezultatele testelor de inhibiție nu pot fi întotdeauna ușor de interpretat din cauza aportului de DOC al substanței testate, o reducere semnificativă a ratei de îndepărtare a DOC total, în raport cu cea controlului, este un semn pozitiv că există efecte toxice.

35. Ca urmare a concentrațiilor de testare relativ mari utilizate în raport cu cea mai mare parte a sistemelor naturale (și în consecință, a unui raport nefavorabil între concentrațiile substanțelor testate și a altor surse de carbon), metoda trebuie considerată ca test preliminar care poate fi utilizat pentru a indica dacă o substanță este sau nu ușor degradabilă. Prin urmare, un rezultat slab nu înseamnă în mod necesar că substanța testată nu este biodegradabilă în medii marine, ci indică faptul că pentru a stabili aceasta vor fi necesare studii suplimentare.

Un exemplu de experiment teoretic privind degradarea ilustrând un mod fezabil de estimare a valorilor t_L (durata „fazei de latență”) și t_{50} (intervalul de timp, începând de la t_L), necesare pentru a obține o îndepărtare în proporție de 50 %, este oferit în figura de mai jos.

▼M6



METODA FLACONULUI ÎNCHIS

INTRODUCERE

1. Această metodă este o variantă de testare cu apă de mare prin testul cu flaconul închis (5) și a fost finalizată în urma unui test interlaboratoare organizat pentru Comisia Europeană (CE) de Institutul danez pentru calitatea apei (3).

2. La fel ca în cazul metodei însoțitoare de testare cu apă de mare prin agitarea flaconului, rezultatele acestui test nu trebuie să fie considerate drept indicații ale ușurinței biodegradabilității, însă trebuie să fie utilizate în mod specific pentru a obține informații privind biodegradabilitatea substanțelor din mediile marine.

PRINCIPIUL METODEI

3. O cantitate predeterminată de substanță testată este dizolvată în mediul de testare într-o concentrație, de obicei, de 2 – 10 mg de substanță testată per litru (pot fi utilizate una sau mai multe concentrații). Soluție este păstrată într-un flacon plin, închis, la întuneric, într-o baie cu temperatură constantă sau într-o incintă controlată la ± 1 °C în intervalul 15 – 20 °C. În cazurile în care obiectivul studiului este acela de a simula condițiile de mediu, testele pot fi efectuate în afara acestui interval normal de temperatură, cu condiția efectuării ajutărilor adecvate pentru a controla temperatura. Degradarea este urmată de analizele oxigenului pe parcursul unei perioade de 28 de zile.

4. Testul interlaboratoare a indicat că dacă testul se prelungește peste perioada de 28 de zile, nu pot fi colectate informații utile, în cele mai multe dintre cazuri, din cauza interferențelor severe. Valorile consumului biologic de oxigen (*biological oxygen demand* – BOD) pentru martor au fost excesiv de mari, probabil din cauza creșterii parietale, ca urmare a neagitării și a nitrificării. Așadar, durata recomandată este de 28 de zile, însă dacă valoarea BOD pentru martor se menține în limita a 30 % (punctele 15 și 40), perioada de testare poate fi prelungită.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

5. Pentru a ști dacă testul poate fi aplicat unei anumite substanțe, trebuie să fie cunoscute anumite proprietăți ale acesteia. Este necesară formula empirică pentru a putea calcula consumul teoretic de oxigen (*theoretical oxygen demand* – ThOD) (a se vedea apendicele 3); altfel, consumul chimic de oxigen (*chemical oxygen demand* – COD) al substanței trebuie să fie determinat pentru a servi ca valoare de referință. Utilizarea COD este mai puțin satisfăcătoare, deoarece unele substanțe nu sunt complet oxidate în testul COD.

▼M6

6. Solubilitatea substanței trebuie să fie de minimum 2 mg/l, deși, în principiu, ar putea fi testate substanțe mai puțin solubile (de exemplu, folosind ultrasonicarea), la fel cum ar putea fi testate și substanțele volatile. Sunt necesare informații privind puritatea sau proporțiile relative ale componentelor majore ale substanței testate pentru ca rezultatele obținute să poată fi interpretate, în special atunci când rezultatul se situează aproape de nivelul de „trecere”.

7. Informațiile privind toxicitatea substanței pentru bacterii, de exemplu astfel cum este măsurată în testele de respirație pe termen scurt (4), pot fi foarte utile atunci când sunt selectate concentrațiile de testare corespunzătoare și pot fi esențiale pentru interpretarea corectă a valorilor mici ale biodegradabilității. Cu toate acestea, astfel de informații nu sunt întotdeauna suficiente pentru interpretarea rezultatelor obținute în testarea biodegradării, iar procedura descrisă la punctul 27 este mai adecvată.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

8. Trebuie utilizate substanțe de referință adecvate pentru a verifica activitatea microbiană a eșantionului de apă de mare. Anilina, acetatul de sodiu sau benzoatul de sodiu (de exemplu) pot fi utilizate în acest scop. O degradare a acestor substanțe în proporție de cel puțin 60 % (din ThOD-ul lor) trebuie să intervină într-un interval de timp rezonabil de scurt, altfel se recomandă ca testul să fie repetat folosind alt eșantion de apă de mare.

9. În testul interlaboratoare organizat de CE în urma căruia au fost prelevate eșantioane de apă de mare din diferite locații și în momente diferite pe parcursul anului, faza de latență (t_L) și timpul necesar obținerii unei degradări de 50 % (t_{50}), neincluzând faza de latență, au fost de 0 – 2 zile și, respectiv, de 1 ± 4 zile pentru benzoatul de sodiu. Pentru anilină, valorile t_L și t_{50} au fost de 0 – 7 zile și, respectiv, de 2 – 12 zile.

REPRODUCTIBILITATE

10. Reproductibilitatea metodelor a fost stabilită prin testul interlaboratoare organizat de CE (3).

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

11. Echipament de laborator obișnuit și:

(a) Pot fi utilizate flacoane BOD de 250 – 300 ml cu dop de sticlă sau flacoane cu gât îngust de 250 ml cu dop de sticlă;

(b) Mai multe flacoane de 2-, 3- și 4- litri cu gradație pentru litri pentru pregătirea experimentului și pentru umplerea flacoanelor BOD;

(c) Baie de apă sau o cameră cu temperatură constantă pentru păstrarea flacoanelor la temperatură constantă (± 1 °C) ferite de lumină.

(d) Echipament pentru analiza oxigenului dizolvat;

(e) Filtre cu membrană, 0,2 – 0,45 μm (opțional);

(f) Echipamente pentru analize specifice (opțional).

Apa de mare

12. Se prelevează un eșantion de apă de mare într-un recipient curățat cu atenție și se transportă la laborator, de preferință în termen de o zi sau două după prelevare. Pe durata transportului, temperatura eșantionului nu trebuie lăsată să depășească semnificativ temperatura care urmează să fie utilizată în test.

▼**M6**

13. Locația de unde a fost prelevat eșantionul se identifică cu precizie și se descrie situația poluării și a nutrienților. În special pentru apele de coastă sau poluate, această descriere trebuie să includă numărul coloniilor microbiene heterotrofe și determinarea concentrațiilor azotatului, amoniului și fosfatului dizolvați.

14. Se furnizează următoarele informații pentru eșantionul de apă de mare:

— data prelevării;

— adâncimea de prelevare;

— aspectul eșantionului – tulbure etc.;

— temperatura la momentul prelevării;

— salinitatea;

— carbonul organic dizolvat (DOC);

— intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test.

15. În cazul în care conținutul de DOC dintr-un eșantion se dovedește a fi mare sau în care se consideră că BOD pentru martor după 28 de zile va fi mai mare de 30 % din cel al substanțelor de referință, se recomandă ca apa de mare să fie învechită timp de aproximativ o săptămână înainte de utilizare.

16. Eșantionul se învechește prin depozitare în condiții aerobe la temperatura de testare, la întuneric sau la lumină difuză. Dacă este necesar, condițiile aerobe sunt menținute prin aerare ușoară. Pe durata învechirii, conținutul materialului organic ușor degradabil este redus. În testul interlaboratoare (3), nu au fost observate diferențe între potențialele de degradare ale eșantioanelor de apă de mare învechite sau recent prelevate.

17. Înainte de utilizare, apa de mare este tratată în prealabil pentru a îndepărta particulele mari, de exemplu prin filtrare cu ajutorul unui filtru din nailon sau al unui filtru de hârtie cu porozitate mare (fără membrană sau filtre GF-C) sau prin sedimentare și decantare. Procedura utilizată se raportează. După învechire se pretratează, dacă se utilizează.

Soluții stoc pentru nutrienți minerali

18. Se prepară următoarele soluții stoc folosind reactivi de puritate analitică:

(a)	Ortofosfat diacid monopotasic, KH_2PO_4	8,5 g
	Ortofosfat acid dipotasic, K_2HPO_4	21,75 g
	Ortofosfat acid disodic dihidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,3 g
	Clorură de amoniu, NH_4Cl	0,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(b)	Clorură de calciu, $CaCl_2$	27,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(c)	Sulfat de magneziu heptahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,5 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	
(d)	Clorură de fier (III) hexahidrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Se dizolvă și se completează cu apă distilată până la 1 l.	

▼M6

Precipitarea în soluție (d) poate fi prevenită prin adăugarea unei picături de HCl concentrat sau a 0,4 g de acid etilendiaminotetraacetic (EDTA, sare disodică) per litru. Dacă se formează un precipitat într-o soluție stoc, aceasta trebuie înlocuită cu o soluție nou preparată.

Pregătirea mediului de testare

19. Se adaugă pentru fiecare litru de apă de mare pretratată 1 l din fiecare dintre soluțiile stoc sus-menționate. Se saturează mediul de testare cu aer la temperatura de testare prin aerarea cu aer comprimat curat timp de aproximativ 20 de minute. Se determină concentrația oxigenului dizolvat pentru control. Concentrația saturată a oxigenului dizolvat ca funcție a salinității și temperatura pot fi citite în nomograma anexată la această metodă de testare (apendicele 4).

Inoculul

20. Nu se adaugă un inocul specific în plus față de microorganismele care sunt deja prezente în apa de mare. Se determină (opțional) numărul de heterotrofe care formează colonii în mediul de testare cu apă de mare (și, de preferință, și în eșantionul de apă de mare original), de exemplu, prin numărarea pe placă utilizând agar marin. Acest lucru este de dorit în special pentru eșantioanele prelevate din locații costiere sau poluate. Se verifică activitatea microbiană heterotrofă în apa de mare prin realizarea unui test cu o substanță de referință.

Pregătirea flacoanelor de testare

21. Se efectuează toate manipulările necesare, inclusiv învechirea și pretratarea apei de mare la temperatura de testare aleasă între 15 și 20 °C, asigurând curățenia, dar nu sterilitatea, tuturor vaselor din sticlă.

22. Se pregătesc grupuri de flacoane BOD pentru determinarea BOD cu substanțele testată și de referință în serii experimentale simultane. Se efectuează toate analizele pe flacoanele duplicat (martor, substanțe de referință și testată), adică se pregătesc două flacoane pentru fiecare determinare. Se efectuează analize cel puțin în zilele 0, 5, 15 și 28 (patru determinări). Pentru analizele oxigenului, patru determinări necesită un total de $3 \times 2 \times 4 = 24$ de flacoane (martor, substanță de referință și substanță testată) și, prin urmare, aproximativ 8 litri de mediu de testare (pentru o concentrație de substanță testată).

23. Se prepară soluții separate pentru substanțele de referință și testată în flacoane mari cu un volum suficient (punctul 11) prin adăugarea mai întâi a substanțelor testată și de referință, fie direct, fie prin utilizarea unei soluții stoc concentrate în flacoanele mari parțial umplute. Se adaugă mediu de testare suplimentar pentru a se asigura concentrațiile dorite finale. În cazul în care sunt utilizate soluții stoc de substanță testată și/sau de referință, se asigură faptul că salinitatea mediului cu apă de mare nu este modificată în mod semnificativ.

24. Se selectează concentrațiile substanțelor testată și de referință ținând cont de:

(a) solubilitatea oxigenului dizolvat în apa de mare la temperatura de testare predominantă și salinitatea (a se vedea nomograma anexată – apendicele 4);

(b) valoarea BOD a apei de mare din martor; și

(c) biodegradabilitatea preconizată a substanței testate.

▼M6

25. La 15 °C și 20 °C și la o salinitate de 32 de părți la mie (apă de ocean), solubilitatea oxigenului dizolvat este de aproximativ 8,1 și 7,4 mg/l, respectiv. Consumul de oxigen al apei de mare înseși (respirație martor) poate fi de 2 mg O_2/l sau mai mult, în cazul în care apa de mare nu este învechită. Prin urmare, în vederea asigurării unei concentrații semnificative de oxigen care să rămână după oxidarea substanței testate, se utilizează o concentrație inițială a substanței testate de aproximativ 2 – 3 mg/l (în funcție de ThOD) pentru substanțele pentru care se preconizează că se vor degrada complet în condițiile testului (precum substanțele de referință). Substanțele mai puțin degradabile se testează la concentrații mai mari, de până la aproximativ 10 mg/l, cu condiția să nu apară efecte toxice. Efectuarea de teste paralele cu o concentrație mică (aproximativ 2 mg/l) și mare (aproximativ 10 mg/l) a substanței testate poate fi avantajoasă.

26. Un martor pentru oxigen trebuie să fie determinat în paralel în flacoanele care nu conțin nici substanță testată, nici substanță de referință.

27. Dacă trebuie determinate efecte inhibitorii, se pregătește următoarea serie de soluții în flacoane mari separate (punctul 13):

(a) 2 mg/l de substanță ușor degradabilă, de exemplu orice substanță de referință menționată;

(b) x mg/l de substanță testată (x este în general 2);

(c) 2 mg/l de substanță ușor degradabilă plus x mg/l de substanță testată.

Test fizico-chimic de control (opțional)

28. Dacă se recurge la opțiunea utilizării de analize specifice, poate fi realizat un experiment fizico-chimic pentru a verifica dacă substanța testată este îndepărtată prin mecanisme abiotice, precum hidroliza sau adsorbția. Un test fizico-chimic de control poate fi efectuat prin adăugarea de clorură de mercur (II) ($HgCl_2$) [1] (50 – 100 mg/l) în flacoanele duplicat cu substanță testată pentru a opri activitatea microbiană. O scădere semnificativă a concentrației substanței specifice în cursul testului indică prezența unor mecanisme de îndepărtare abiotice.

Numărul de flacoane BOD într-o testare tipică

29. Într-o testare tipică sunt folosite următoarele flacoane:

— cel puțin 8 care conțin substanța testată;

— cel puțin 8 care conțin numai apă de mare fortificată cu nutrienți;

— cel puțin 8 care conțin substanța de referință și dacă este necesar

— 6 flacoane care conțin substanță testată și de referință (control pentru toxicitate).

PROCEDURA

30. După preparare, se sifonează imediat fiecare soluție, din sfertul inferior (nu din partea de jos) într-un flacon suficient de mare, pentru a umple respectivul grup de flacoane BOD. Imediat se analizează controalele zero (timp zero) pentru oxigenul dizolvat (punctul 33) sau se conservă pentru analiză chimică ulterioară prin precipitare cu $MnCl_2$ [clorură de mangan (II)] și NaOH (hidroxid de sodiu).

[1] Clorura de mercur (II) ($HgCl_2$) este o substanță foarte toxică ce trebuie manipulată luând măsuri de precauție adecvate. Deșeurile apoase care conțin această substanță trebuie evacuate în mod corespunzător; ele nu trebuie să fie eliminate în sistemul pentru ape reziduale.

▼M6

31. Se incubează flacoanele BOD paralele rămase la temperatura de testare (15 – 20 °C), se mențin în întuneric și se scot din zona de incubare la intervale de timp adecvate (de exemplu, după minimum 5, 15 și 28 zile) și se analizează oxigenul dizolvat (punctul 33).

32. Se filtrează cu filtru cu membrană (0,2 – 0,45 μm) sau se centrifughează, timp de 15 minute, eșantioanele pentru analize specifice (opțional). Se depozitează timp de până la 48 de ore la 2 – 4 °C sau perioade mai lungi la – 18 °C, dacă nu sunt analizate imediat (dacă se știe că substanța testată nu va fi afectată, se acidifică la pH 2 înainte de depozitare).

Determinarea oxigenului dizolvat

33. Se determină concentrația oxigenului dizolvat folosind o metodă chimică sau electrochimică recunoscută la nivel național sau internațional.

DATE ȘI RAPORTARE

Prelucrarea rezultatelor

34. Se înregistrează rezultatele analitice pe fișele de date anexate (apendicele 5).

35. Se calculează BOD ca diferența de depleție de oxigen între un martor și o soluție a substanței testate în condițiile de testare. Se împarte depleție netă de oxigen la concentrația (G/V) substanței pentru a exprima BOD ca mg BOD/mg substanță testată. Degradarea este definită ca raportul dintre consumul biochimic de oxigen și, de preferință, consumul teoretic de oxigen (ThOD) sau consumul chimic de oxigen (COD) și se exprimă ca procent (a se vedea punctul 36).

36. Se calculează valorile biodegradării pentru fiecare moment de eșantionare pentru substanța chimică testată și pentru substanța de referință, utilizând una dintre ecuațiile:

$$\%\ biodegradare = \frac{mg\ O_2/mg\ substanță\ testată}{mg\ ThOD/mg\ substanță\ testată} \times 100$$

$$\%\ biodegradare = \frac{mg\ O_2/mg\ substanță\ testată}{mg\ COD/mg\ substanță\ testată} \times 100$$

unde:

ThOD = consumul teoretic de oxigen (calculare, apendicele 3)

COD = consumul chimic de oxigen, determinat experimental.

Notă: Uneori, cele două modalități de calculare (procent din ThOD sau procent din COD) nu furnizează aceleași rezultate; se preferă să utilizeze ThOD, deoarece unele substanțe nu sunt complet oxidate în testul COD.

37. Se ilustrează în mod grafic curba de degradare într-o diagramă (a se vedea un exemplu în secțiunea „Validitatea și interpretarea rezultatelor”). Dacă există suficiente date, din această curbă se calculează faza de latență t_L) și timpul necesar pentru a obține îndepărtarea în proporție de 50 % de la încheierea fazei de latență (t_{50}).

38. Dacă se folosește analiza specifică (opțional), se precizează degradarea primară ca procent al îndepărtării substanței specifice în perioada de testare (corectată pentru martorii analitici).

▼M6

Raportul privind testul

39. Raportul privind testul trebuie să conțină următoarele informații:

Substanța testată:

— natura fizică și, dacă este relevant, proprietățile fizico-chimice;

— date de identificare.

Condiții de testare:

— locul prelevării de eșantioane și descrierea sa: situația poluării și a nutrienților (numărul coloniilor, azotat, amoniu, fosfat, dacă este cazul);

— caracteristicile eșantionului [data eșantionării, adâncimea, aspectul, temperatura, salinitatea, DOC (opțional), intervalul de timp dintre prelevare și utilizarea în test];

— metoda utilizată (dacă este cazul) pentru învechirea apei de mare;

— metoda utilizată pentru pretratarea (filtrare/sedimentare) apei de mare;

— metoda utilizată pentru determinarea COD (dacă este efectuată);

— metoda utilizată pentru măsurarea oxigenului;

— procedura de dispersie pentru substanțele care sunt puțin solubile în condițiile de testare;

— metoda utilizată pentru determinarea numărului de heterotrofe în apa de mare (metoda de numărare pe placă sau o procedură alternativă);

— metoda utilizată pentru determinarea DOC în apa de mare (opțional);

— metoda utilizată pentru analize specifice (opțional);

— alte metode opționale utilizate pentru caracterizarea apei de mare (măsurători ale ATP etc.).

Rezultate:

— datele analitice raportate în fișa de date (astfel cum este anexată, apendicele 5);

— evoluția testului de degradare reprezentată grafic într-o diagramă indicând faza de latență (t_L), panta și timpul (începând cu sfârșitul fazei de latență) necesar atingerii absorbție finale a oxigenului proporție de 50 % (t_{50}) cauzate de oxidarea substanței testate. Faza de latență poate fi estimată grafic astfel cum se indică în figura atașată sau considerată, în mod convențional, ca fiind timpul necesar pentru o degradare de 10 %;

— procentul de degradare măsurat după 28 de zile.

Discutarea rezultatelor.

Validitatea și interpretarea rezultatelor

40. Respirația martor nu trebuie să depășească 30 % din oxigenul din flaconul de testare. Dacă nu este posibil să se respecte acest criteriu folosind apă de mare proaspăt prelevată, apa de mare trebuie să fie învechită (stabilizată) înainte de utilizare.

41. Trebuie luată în considerare posibilitatea ca substanțele care conțin azot să afecteze rezultatele.

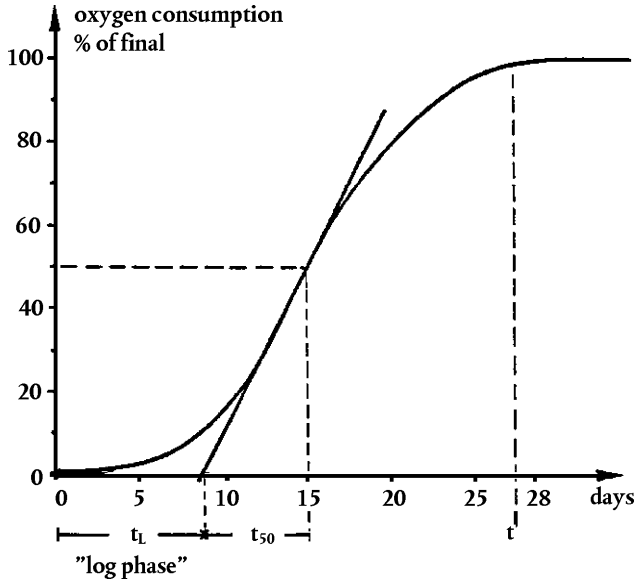
▼M6

42. Rezultatele obținute cu substanțele de referință benzoat de sodiu și anilină trebuie să fie comparabile cu rezultatele obținute în testul interlaboratoare (3) (punctul 9). Dacă rezultatele obținute cu substanțele de referință sunt atipice, testul trebuie repetat folosind alt eșantion de apă de mare.

43. Substanța testată poate fi considerată inhibitoare pentru bacterii (la concentrația utilizată) dacă BOD a amestecului dintre substanța de referință și cea testată este mai mic decât suma BOD pentru soluțiile separate ale celor două substanțe.

44. Ca urmare a concentrațiilor relativ mari utilizate în test față de cea mai mare parte a sistemelor naturale și, în consecință, a unui raport nefavorabil între concentrațiile substanțelor testate și a altor surse de carbon, metoda trebuie considerată ca test preliminar care poate fi utilizat pentru a indica dacă o substanță este sau nu ușor biodegradabilă. Prin urmare, un rezultat slab nu înseamnă în mod necesar că substanța testată nu este biodegradabilă în medii marine, ci indică faptul că pentru a stabili acest aspect vor fi necesare studii suplimentare.

Mai jos este prezentat un exemplu de experiment de degradare teoretică ilustrând un mod fezabil de estimare a valorilor t_L (durata „fazei de latență") și t_{50}, intervalul de timp (începând de la tL) necesare pentru a atinge 50 % din absorbția finală de oxigen cauzată de oxidarea substanței testate:



BIBLIOGRAFIE

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Chapter C.4-B of this Annex: Determination of „Ready" Biodegradability Part III Modified OECD Screening Test

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Chapter C.11 of this Annex: Biodegradation — Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.

(5) Chapter C.4-E of this Annex: Determination of „Ready" Biodegradability, Part VI. Closed Bottle Test.

▼**M6**

Apendicele 1

Determinarea carbonului organic din apa de mare

METODA AGITĂRII FLACONULUI

Pentru determinarea carbonului organic dintr-un eșantion de apă, compușii organici din eșantion sunt oxidați la bioxid de carbon folosind în general una din următoarele trei tehnici:

— oxidare umedă prin persulfat/iradiere UV;

— oxidare umedă prin persulfat/temperatură crescută (116-130 °C);

— combustie.

CO_2 degajat este cuantificat folosind spectrometrie cu infraroșu sau titrimetrie. Alternativ, CO_2 este redus la metan, care este cuantificat cu un detector cu ionizare în flacără (*flame ionization detector* – FID).

Metoda cu persulfat/UV este frecvent utilizată pentru analiza apei „curate”, cu conținut mic de particule în suspensie. Ultimele două metode pot fi aplicate la cele mai multe tipuri de eșantioane de apă, metode cu persulfat/temperatură crescută-oxidare fiind cea mai potrivită pentru eșantioanele cu nivel mic, iar tehnica cu combustie fiind aplicabilă pentru eșantioane cu conținut de carbon organic nevolatil (*non-volatile organic carbon* – NVOC) mult peste 1 mg C/l.

Interferențe

Toate cele trei metode sunt dependente de eliminarea sau de compensarea carbonului anorganic (*inorganic carbon* – IC) prezent în eșantion. Epurarea CO_2 eșantionul acidifiat este cea mai frecvent utilizată metodă de eliminare a IC, cu toate că aceasta determină și o pierdere de compuși organici volatili (1). Eliminarea completă sau compensarea IC trebuie să se asigure pentru fiecare matrice de eșantion, iar carbonul organic volatil (*volatile organic carbon* – VOC) trebuie să fie determinat în plus față de NVOC, în funcție de tipul de eșantion.

Concentrațiile mari de clorură au ca rezultat scăderea eficienței oxidării folosind metoda cu persulfat/UV (2). Aplicarea unui reactiv de oxidare modificat prin adăugarea de azotat de mercur (II) poate, totuși, să elimine această interferență. Se recomandă ca volumul maxim tolerabil al eșantionului să fie utilizat pentru a evalua fiecare tip de eșantion care conține clorură. Concentrațiile mari de sare din eșantionul analizat folosind metoda prin combustie poate provoca acoperirea cu sare a catalizatorului și coroziunea excesivă a tubului de ardere. Trebuie luate măsuri de precauție în conformitate cu manualul producătorului.

Eșantioanele de apă foarte tulburi, precum și eșantioanele care conțin particule poate fi oxidate incomplet atunci când se utilizează metoda persulfat/UV.

Un exemplu de metodă adecvată

Carbonul organic nevolatil este determinat prin oxidarea cu persulfat/iradiere UV și cuantificarea ulterioară a emisiilor de CO_2 degajate folosind spectrometrie nedispersivă cu infraroșu.

Reactivul de oxidare se modifică în conformitate cu sugestiile prezentate în referința (2), astfel cum se descrie în manualul producătorului:

a) 8,2 g $HgCl_2$ și 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ se dizolvă în câteva sute de mililitri de apă de reacție cu o concentrație mică de carbon.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ se dizolvă în soluție de sare mercurică.

▼M6

c) 5 ml HNO_3 (conc.) se adaugă la amestec.

d) reactivul este diluat până la 1 000 ml.

Interferența clorurii este îndepărtată cu ajutorul unui volum de eșantion de 40 µl pentru clorură 10 % și al unui volum de eșantion de 200 µl pentru clorură 1,9 %. Eșantioanele cu concentrații mari de clorură și/sau volumele mai mari de eșantioane pot fi analizate în baza acestei metode, cu condiția ca acumularea de clorură în vasul de oxidare să fie împiedicată. Determinarea carbonului organic volatil poate fi realizată ulterior, dacă este cazul, pentru tipul de eșantion în cauză.

BIBLIOGRAFIE

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Also of interest (gives a description of an autoanalysis system):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼M6

Apendicele 2

Biodegradarea în apa de mare

METODA AGITĂRII FLACONULUI

FIȘA DE DATE

1. **LABORATOR:**

2. **DATE ÎNCEPERII TESTULUI:**

3. **SUBSTANȚA TESTATĂ:**

Denumire:

Concentrația soluției stoc: mg/l de substanță

Concentrația inițială în mediu, t_o: mg/l de substanță

: mg DOC/l

4. **APA DE MARE:**

Sursa:

Data prelevării:

Adâncimea de prelevare:

Aspectul la momentul prelevării (de exemplu, tulbure etc.):

Salinitatea la prelevare: ‰

Temperatura la prelevare: °C

DOC „x” ore după prelevare: mg/l

Pretratare înainte de testare (de exemplu, filtrare, sedimentare, învechire, etc.):

Numărul coloniilor microbiene — eşantion inițial: colonii/ml

— la începutul testului: colonii/ml

Alte caracteristici:

5. **DETERMINĂRILE CARBONULUI:**

Analizorul de carbon:

	Flacon nr.		DOC după n zile (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: apă de mare fortificată cu nutrienți cu substanță testată	1	a_1					
		a_2					
		medie, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		medie, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Flacon nr.		DOC după n zile (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Martor: apă de mare fortificată cu nutrienți fără substanță testată	1	c_1					
		c_2					
		medie, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		medie, $C_{d(t)}$					
	medie, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALUAREA DATELOR BRUTE:**

Flacon nr.	Calcularea rezultatelor	% Degradare după n zile				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Medie (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D1 și D2 nu se exprimă ca medie, dacă există o diferență considerabilă.

Notă: Formate similare pot fi folosite atunci când degradarea este urmată de o analiză specifică și pentru substanța de referință și controalele de toxicitate.

7. **DEGRADARE ABIOTICĂ (opțional)**

	Timp (zile)	
	0	t
Concentrație DOC (mg/l) în controlul steril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%degradare\ abiotică = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Apendicele 3

Calcularea consumului biochimic teoretic de oxigen

METODA FLACONULUI ÎNCHIS

ThOD al substanței $C_cH_hCl_clN_nNa_{na}O_oP_pS_s$ cu masa moleculară (*molecular weight* – MW) se calculează în conformitate cu:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Acest calcul implică faptul că C este mineralizat la CO_2, H la H_2O, P la P_2O_5 și Na la Na_2O. Halogenul este eliminat sub formă de halogenură de hidrogen, iar azotul sub formă de amoniac

Exemplu:

Glucoză $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ glucoză$$

Greutățile moleculare ale altor săruri decât cele ale metalelor alcaline sunt calculate pe baza ipotezei că respectivele săruri au fost hidrolizate.

Se presupune că sulful este oxidat la starea + 6.

Exemplu:

n-Dodecilbenzensulfonat de sodiu $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ substanță$$

În cazul substanțelor care conțin azot, acesta poate fi eliminat sub formă de amoniac, nitrit sau nitrat corespunzând diferitelor consumuri biochimice teoretice de oxigen.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

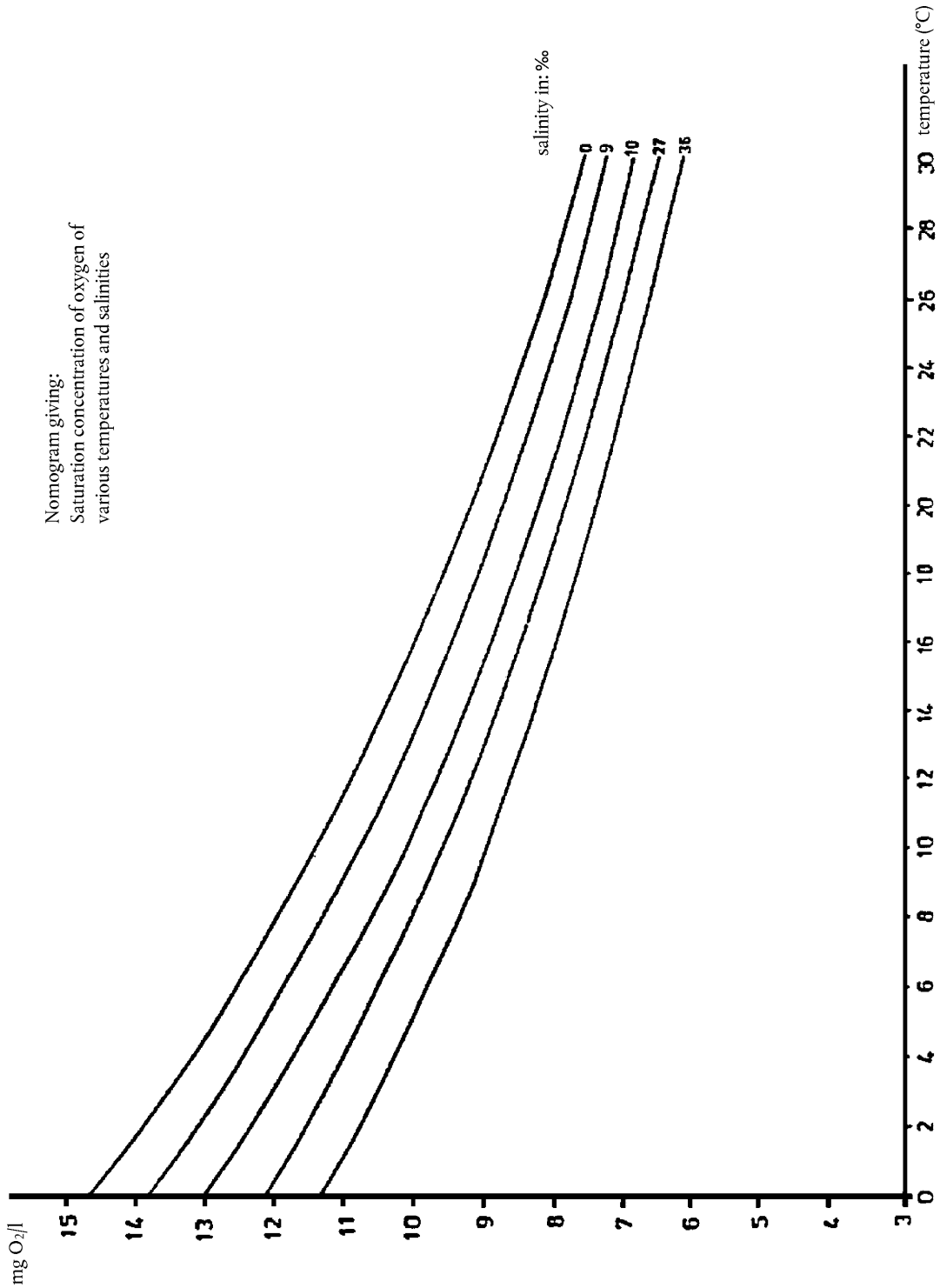
Se presupune că în cazul unei amine secundare a fost observată prin analiză formarea completă de nitrat:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ substanță$$

▼**M6**

Apendicele 4



▼M6

Apendicele 5

Biodegradarea în apa de mare

METODA FLACONULUI ÎNCHIS

FIȘA DE DATE

1. **LABORATOR:**

2. **DATE ÎNCEPERII TESTULUI:**

3. **SUBSTANȚA TESTATĂ:**

Denumire:

Concentrația soluției stoc:	mg/l
Inclusiv concentrația în mediul de apă de mare:	mg/l
ThOD sau COD:	mg O_2/mg substanță testată

4. **APA DE MARE:**

Sursa:

Data prelevării:

Adâncimea de prelevare:

Aspectul la momentul prelevării (de exemplu, tulbure etc.):

Salinitatea la prelevare:	‰
Temperatura la prelevare:	°C
DOC „x” ore după prelevare:	mg/l

Pretratare înainte de testare (de exemplu, filtrare, sedimentare, învechire etc.):

Numărul coloniilor microbiene	— eșantion inițial:	colonii/ml
	— la începutul testului:	colonii/ml

Alte caracteristici:

5. **MEDIU DE TESTARE:**

Temperatura după aerare:	°C
Concentrația de O_2 după aerare și înainte de începerea testului:	mg O_2/l

6. **DETERMINAREA OD:**

Metoda: Winkler/electrod

	Flacon nr.		mg O_2/l după n zile			
			0	5	15	28
Test: apă de mare fortificată cu nutrienți cu substanță testată	1	a_1				
	2	a_2				
	Media testului	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Flacon nr.		mg O_2/l după n zile			
			0	5	15	28
Martor: apă de mare fortificată cu nutrienți, dar fără substanță testată	1	c_1				
	2	c_2				
	Medie martor	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Notă: Un format similar poate fi folosit pentru substanța de referință și controalele de toxicitate.

7. **CONSUM DE OD: % DEGRADARE (%D):**

	Consum de OD după n zile		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{substanța\ testată(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] Aceasta presupune că $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, unde
$m_{b(o)}$ = valoarea martor în ziua 0,
$m_{t(o)}$ = valoarea substanței de testare în ziua 0.
Dacă $m_{b(o)}$ nu este egal cu $m_{t(o)}$, se utilizează $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, unde
$m_{b(x)}$ = valoarea martor în ziua x,
$m_{t(x)}$ = valoarea substanței de testare în ziua x.

▼M6

C.43. BIODEGRADABILITATEA ANAEROBĂ A SUBSTANȚELOR ORGANICE DIN NĂMOLUL FERMENTAT: PRIN MĂSURAREA PRODUCERII DE GAZE

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 311 (2006). Există o serie de teste de screening pentru evaluarea biodegradabilității aerobe a substanțelor organice [metodele de testare C.4, C.9, C.10, C.11 și (1) și Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 302 C (2)], iar rezultatele aplicării acestora au fost utilizate cu succes pentru a prevedea soarta substanțelor în mediul aerob, în special în etapele aerobe de tratare a apelor uzate. Diferite proporții de substanțe insolubile în apă, precum și ale celor care se adsorb pe solidele din apa uzată, sunt de asemenea tratate aerobic, întrucât ele sunt prezente în apă uzată decantată. Cu toate acestea, fracțiunile mai mari ale acestor substanțe sunt legate de nămol decantat primar, care este separat de nămolul brut în bazine de decantare înainte ca nămolul decantat sau supernatant să fie tratat aerobic. Nămolul, care conține o parte dintre substanțele solubile în lichidul interstițial, este apoi transmis către bazinele de fermentare încălzite pentru tratament anaerob. Deocamdată nu există teste în această serie pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe în bazine de fermentare anaerobă, iar acest test vizează remedierea acestei lacune; nu este în mod necesar aplicabil la alte compartimentele de mediu anoxice.

2. Tehnici respirometrice care măsoară cantitățile de gaze produse, în special metanul (CH_4) și dioxidul de carbon (CO_2), în condiții anaerobe au fost utilizate cu succes pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe. Birch et al. (3) a revizuit aceste proceduri și a concluzionat că activitatea realizată de Shelton și Tiedje (4), pe baza studiilor anterioare (5) (6) (7), a fost cea mai cuprinzătoare. Metoda (4), care a fost dezvoltat în continuare prin altele (8) și a fost inclusă în standardele americane (9) (10), nu a rezolvat problemele legate de solubilitățile diferite ale CO_2 și CH_4 în mediul de testare și de calculare a producției teoretice de gaz a unei substanțe testate. Raportul ECETOC (3) a recomandat măsurarea suplimentară a conținutului de carbon anorganic dizolvat (*dissolved inorganic carbon* – DIC) în lichidul supernatant, care a făcut ca tehnica să fie aplicabilă la scară mai largă. Metoda ECETOC a fost supusă unui exercițiu internațional de calibrare (sau test interlaboratoare) și a devenit standardul ISO 11734 (11).

3. Această metodă de testare, care se bazează pe ISO 11734 (11), descrie o metodă de screening pentru evaluarea potențialului de biodegradabilitate anaerobă a substanțelor organice în condiții specifice (de exemplu, într-un bazin de fermentare anaerobă la un moment dat și pentru un interval de concentrații ale microorganismelor). Întrucât un nămol diluat este utilizat la o concentrație relativ mare a substanței testate, iar durata testului este în general mai mare decât timpul de retenție în bazinele de fermentare anaerobă, condițiile de testare nu corespund în mod necesar condițiilor din bazinele de fermentare anaerobă și nici nu este aplicabil pentru evaluarea biodegradabilității anaerobe a substanțelor organice în condiții de mediu diferite. Nămolul este expus la substanța testată până la 60 de zile, ceea ce este mai mult decât timpul normal de retenție a nămolului (25 – 30 de zile) în bazinele de fermentare anaerobă, deși în locațiile industriale timpul de retenție poate fi mult mai mare. Predicțiile din rezultatele acestui test nu pot fi făcute la fel de convingător ca în cazul biodegradării aerobe, întrucât dovezile acumulate cu privire la comportamentul substanțelor testate în testele aerobe „imediate” și în testele de simulare și în mediul aerobic sunt suficiente pentru a considera că există o legătură; există puține dovezi similare pentru mediul anaerob. Se poate presupune că

▼M6

biodegradarea anaerobă completă apare dacă 75 % – 80 % din producția de gaze teoretică este atinsă. Rapoartele mari de substanță în raport cu biomasa utilizate în aceste teste înseamnă că o substanță care trece este mai probabil să fie degradată într-un bazin de fermentare anaerobă. În plus, substanțele care nu pot fi transformate în gaze în test nu persistă în mod necesar în condițiile unor rapoarte substanță-biomasă în mediu mai realiste. În plus, apar alte reacții anaerobe prin care substanțele pot fi cel puțin parțial degradate, de exemplu prin declorurare, dar acest test nu detectează astfel de reacții. Totuși, prin aplicarea unor metode analitice specifice pentru determinarea substanței testate, dispariția acesteia poate fi monitorizată (a se vedea punctele 6, 30, 44 și 53).

PRINCIPIUL TESTULUI

4. Nămolul fermentat spălat ([1]), care conține concentrații mici (< 10 mg/l) de carbon anorganic (*inorganic carbon* – IC), este diluat de aproximativ zece ori până la o concentrație totală a solidelor de 1 g/l – 3 g/l și se incubează la 35 °C ± 2 °C în vase închise ermetic, cu substanță testată la 20 – 100 mg C/l timp de maximum 60 de zile. Se realizează o ajustare pentru măsurarea activității nămolului prin utilizarea în paralel a unor martori de control cu inocul de nămol în mediu, dar fără substanța testată.

5. Se măsoară creșterea presiunii în spațiul neumplut al vaselor care rezultă din producerea de dioxid de carbon și metan. O mare parte a CO_2 produs va fi dizolvat în faza lichidă sau transformat în carbonat sau hidrogen carbonat în condițiile testului. Acest carbon anorganic este măsurat la sfârșitul testului.

6. Cantitatea de carbon (anorganic plus metan) care rezultă din biodegradarea substanței testate este calculată pe baza producției nete de gaze și a formării nete de IC în faza lichidă în exces față de valorile martorului de control. Amploarea biodegradării se calculează din IC total și C-metanic produse ca procent al cantității măsurate sau calculate a carbonului adăugat ca substanță testată. Evoluția biodegradării poate fi urmărită prin măsurări intermediare doar a producerii de gaze. In plus, biodegradarea primară poate fi determinată prin analize specifice la începutul și sfârșitul testului.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

7. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor trebuie să se cunoască puritatea, solubilitatea în apă, volatilitatea și caracteristicile de absorbție ale substanței testate. Conținutul de carbon organic (% G/G) al substanței testate trebuie să fie cunoscut, fie din structura sa chimică, fie prin măsurare. Pentru substanțele testate volatile, o constantă a legii lui Henry măsurată sau calculată ajută la stabilirea aplicabilității testului. Informațiile privind toxicitatea substanței testate pentru bacteriile anaerobe ajută la selectarea unei concentrații de testare corespunzătoare, precum și la interpretarea rezultatelor care indică o biodegradabilitate slabă. Se recomandă includerea unui control pentru inhibiție, cu excepția cazului în care se știe că substanța testată nu inhibă activitățile microbiene anaerobe [a se vedea punctul 21 și ISO 13641-1 (12)].

([1]) Nămolul fermentat este un amestec de faze stabilizate de epurare și de nămol activat, care au fost incubate într-un bazin de fermentare anaerobă la aproximativ 35 °C pentru a reduce biomasa și problemele de miros și pentru a îmbunătăți capacitatea de eliminare a apei din nămol. El constă într-o asociere de bacterii fermentative și metanogenice anaerobe producătoare de dioxid de carbon și de metan (11).

▼**M6**

APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE

8. Metoda de testare poate fi aplicată pentru substanțele solubile în apă; de asemenea, poate fi aplicată substanțelor greu solubile și insolubile, cu condiția să fie folosită o metodă de dozare exactă, de exemplu a se vedea ISO 10634 (13). În general pentru substanțele volatile este necesar ca deciziile să fie luate de la caz la caz. Trebuie luate măsuri speciale, de exemplu, neeliberarea de gaze pe durata testului.

SUBSTANȚE DE REFERINȚĂ

9. Pentru a verifica procedura, se testează în paralel o substanță chimică de referință prin pregătirea unor vase corespunzătoare ca parte a testărilor normale. Fenolul, benzoatul de sodiu și polietilenglicol 400 sunt exemple și se preconizează că se vor degrada în proporție mai mare de 60 % din producția de gaz teoretică (adică metan și carbon anorganic) în 60 de zile (3) (14).

REPRODUCTIBILITATEA REZULTATELOR TESTĂRII

10. În cadrul unui test interlaboratoare (14) s-a constat o bună reproductibilitate a măsurătorilor presiunii gazelor în vasele triplicat. Devierea standard relativă (coeficientul de variație, *coefficient of variation* – COV) a fost în principal sub 20 %, deși această valoare a crescut de multe ori la > 20 % în prezența substanțelor toxice sau spre finalul perioadei incubație de 60 de zile. Deviațiile mai mari au fost constatate și în vasele cu volum < 150 ml. Valorile finale ale pH-ului mediului de testare au fost situate în intervalul 6,5 – 7.

11. Următoarele rezultate au fost obținute în testul interlaboratoare.

Substanța testată	Date totale n_1	Degradarea medie (din datele totale) (%)	Deviația standard relativă (din datele totale) (%)	Date valide n_2	Degradare medie (din datele valabile) (%)	Deviația standard relativă (din datele valabile) (%)	Date > 60 % degradarea în testele valide n_3
Acid palmitic	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen-glicol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporție de n_2

12. Coeficienții de variație a mediei pentru toate valorile obținute cu acid palmitic și cu polietilenglicol 400 au fost de până la 45 % (n = 36) și, respectiv, de 35 % (n = 38). Atunci când valorile < 40 % și > 100 % au fost omise (prima fiind presupusă a fi cauzată de condițiile suboptime, cea din urmă din motive necunoscute), cei doi COV au fost reduși la 26 % și, respectiv, la 23 %. Proporțiile valorilor „valide” care au atins o degradare de cel puțin 60 % au fost de 70 % pentru acidul palmitic și de 83 % pentru polietilenglicol 400. Proporțiile procentului de biodegradare obținute din măsurarea DIC au fost relativ mici, dar variabile. Pentru acidul palmitic, intervalul a fost de 0 – 35 %, media de 12 %, cu un COV de 92 %, iar pentru polietilenglicol 400 intervalul a fost de 0 – 40 %, media de 24 %, cu un COV de 54 %.

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Aparatură

13. Este necesară utilizarea echipamentelor obișnuite de laborator și a următoarelor:

a. Incubator – fără risc de scântei și cu temperatură controlată de 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. Vase de testare – rezistente la presiune cu o dimensiunea nominală corespunzătoare ([1]), fiecare prevăzut cu un sept impermeabil la gaze, capabil să suporte o presiune de aproximativ 2 bari. Volumul de spațiu neumplut trebuie să fie de aproximativ 10 % – 30 % din volumul total. Dacă biogazele sunt eliberate regulat, este adecvat un volum de spațiu neumplut de aproximativ 10 %, însă în cazul în care gazele sunt eliberate numai la sfârșitul testului, volumul de spațiu neumplut trebuie să fie de 30 %. Se recomandă utilizarea de flacoane de sticlă pentru ser cu un volum nominal de 125 ml și un volum total de aproximativ 160 ml, sigilate cu septuri pentru ser ([2]) și inele din aluminiu atunci când se eliberează presiunea în fiecare moment de prelevare;

c. Un dispozitiv de măsurare a presiunii ([3]) adaptat pentru a permite măsurarea și ventilarea gazelor produse, de exemplu, manometru de precizie manual conectat la un ac de seringă adecvat; o supapă etanșă la gaze cu trei căi facilitează eliberarea presiunii în exces (apendicele 1). Este necesară menținerea volumului intern în tubulatura și supapa transductorului de presiune la un nivel cât mai mic posibil, astfel încât erorile introduse prin neluarea în considerare a volumului echipamentului să fie nesemnificative;

Notă – Citirile presiunii sunt utilizate direct pentru a calcula cantitatea de carbon produsă în spațiul neumplut (punctele 42 – 44). Ca alternativă, citirile presiunii pot fi convertite la volume (la 35 °C, presiune atmosferică) de gaze produse cu ajutorul unui grafic de conversie. Acest grafic este construit cu datele obținute prin injectarea unor volume cunoscute de azot gazos într-o serie de vase de testare (de exemplu, flacoane pentru ser) la at 35 °C +/– 2 °C și înregistrarea citirilor presiunii stabilizate rezultate (a se vedea apendicele 2). Modul de calculare este indicat în nota de la punctul 44.

Avertisment – Trebuie avut grijă să se evite leziunile cauzate de ace atunci când se utilizează microseringi.

d. Analizor de carbon, adecvat pentru determinarea directă a carbonului anorganic în intervalul 1 mg/l – 200 mg/l;

e. Seringi de precizie mare pentru eșantioanele gazoase sau lichide;

f. Agitatoare magnetici și piese auxiliare (opțional);

g. Cutie cu mănuși (recomandată).

Reactivi

14. Se utilizează întotdeauna reactivi cu puritate analitică.

([1]) Dimensiunea recomandată este cuprinsă între 0,1 litri și 1 litru.

([2]) Se recomandă utilizarea de septuri din silicon impermeabile la gaze. Se recomandă, de asemenea, testarea impermeabilității la gaze a dopurilor, în special a septurilor din cauciuc butilic, deoarece mai multe septuri disponibile pe piață nu sunt suficient de etanșe la metan, iar unele septuri nu rămân etanșe atunci când sunt străpunse cu un ac în condițiile testului.

([3]) Dispozitivul trebuie utilizat și calibrat la intervale regulate, conform instrucțiunilor producătorului. În cazul în care este utilizat un manometru având calitatea necesară, de exemplu încapsulat cu o membrană din oțel, nu este necesară nicio calibrare în laborator. Acuratețea calibrării poate fi verificată în laborator cu o măsurătoare într-un singur punct la 1×10^5 Pa în comparație cu un manometru cu afișare mecanică. Atunci când acest punct este măsurat corect, liniaritatea va fi, de asemenea, nealterată. În cazul utilizării altor dispozitive de măsurare (fără calibrare certificată de către producător), se recomandă calibrarea pentru întreg intervalul la intervale regulate.

▼M6

Apă

15. Apă distilată sau deionizată (dezoxigenată prin barbotare cu azot gazos conținând sub 5 µl/l oxigen), care conține carbon organic dizolvat (DOC) într-o concentrație mai mică de 2 mg/l.

Mediul de testare

16. Mediul de diluție se prepară astfel încât să conțină următorii constituenți în cantitățile specificate:

Fosfat diacid de potasiu anhidru (KH_2PO_4)	0,27 g
Fosfat acid disodic dodecahidrat [$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)]	1,12 g
Clorură de amoniu (NH_4Cl)	0,53 g
Clorură de calciu dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Clorură de magneziu hexahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Clorură de fier(II) tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (indicator oxigen)	0,001 g
Sulfură de sodiu nonahidrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Soluții stoc de microelemente (opțional, punctul 18)	10 ml
Se adaugă apa dezoxigenată (punctul 15)	până la 1 litru

Notă: Se utilizează sulfură de sodiu proaspăt obținută sau se spală și se usucă înainte de utilizare, pentru a se asigura că este suficient de reductoare. Testul poate fi efectuat fără a se utiliza o cutie cu mănuși (a se vedea punctul 26). În acest caz, concentrația finală a sulfurii de sodiu în mediu trebuie să fie crescută la 0,2 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ per litru. Sulfura de sodiu poate fi adăugată și dintr-o soluție stoc anaerobă corespunzătoare prin septul flacoanelor de testare închise, întrucât această procedură va reduce riscul de oxidare. Sulfura de sodiu poate fi înlocuită cu citrat de titan (III), care se adaugă prin septul flacoanelor de testare închise la o concentrație finală de 0,8 – 1 mmol/l. Citratul de titan (III) este un agent reductor foarte eficient și cu toxicitate mică, care este preparat după cum urmează: Se dizolvă 2,94 g de citrat trisodic dihidrat în 50 ml de apă dezoxigenată (rezultând o soluție de 200 mmol/l) și se adaugă 5 ml de soluție de clorură de titan (III) de 15 % (G/V). Se neutralizează la pH de 7 ± 0,2 cu alcalin mineral și se distribuie într-un flacon corespunzător sub un curent de azot. Concentrația de citrat de titan (III) din această soluție stoc este de 164 mmol/l.

17. Se amestecă componentele mediului de testare cu excepția agentului reductor (sulfură de sodiu citrat de titan) și se barbotează soluția cu azot gazos timp de aproximativ 20 de minute imediat înainte de utilizare pentru a elimina oxigenul. Apoi se adaugă volumul adecvat de soluție proaspăt preparată de agent reductor (preparat în apă dezoxigenată) chiar înainte de utilizarea mediului. Se ajustează pH-ul mediului, dacă este necesar, cu acid sau alcalin mineral diluat la 7 ± 0,2.

▼M6

Soluțiile stoc de microelemente (opțional)

18. Se recomandă ca mediul de testare să conțină următoarele microelemente pentru a îmbunătăți procesele de degradare anaerobă, în special dacă sunt utilizate concentrații mici (de exemplu 1 g/l) de inocul (11).

Clorură de mangan tetrahidrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Acid boric acid (H_3BO_3)	5 mg
Clorură de zinc ($ZnCl_2$)	5 mg
Clorură de cupru (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Molibdat disodic dihidrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Clorură de cobalt hexahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Clorură de nichel hexahidrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Selenit disodic (Na_2SeO_3)	5 mg
Se adaugă apa dezoxigenată (punctul 15)	până la 1 litru

Substanța testată

19. Se adaugă substanța testată ca soluție, suspensie sau emulsie stoc sau direct în formă solidă sau lichidă sau ca substanță absorbită pe filtru cu fibre din sticlă pentru a obține o concentrație de carbon organic de maximum 100 mg/l. Dacă se utilizează soluții stoc, se prepară o soluție adecvată cu apă (punctul 15) (dezoxigenată în prealabil prin barbotare cu azot gazos) cu o astfel de concentrație încât volumul adăugat să fie mai mic de 5 % din volumul total al amestecului de reacție. Se ajustează pH-ul soluției stoc la pH 7 ± 0,2, dacă este necesar. Pentru substanțele testate care nu sunt suficient de solubile în apă, a se consulta standardul ISO 10634 (13). Dacă se utilizează solvent, se prepară un control suplimentar, în mediul inoculat fiind adăugat numai solventul. A se evita solvenții organici precum cloroformul și tetraclorura de carbon, cunoscute ca fiind inhibitoare ale producției de metan.

Avertisment – A se manipula cu grijă substanțele testate toxice și cele ale căror proprietăți sunt necunoscute.

Substanțe de referință

20. Substanțe de referință, precum benzoatul de sodiu, fenolul și polietilenglicol 400, au fost utilizate cu succes pentru a verifica procedura, fiind biodegradate în proporție de peste 60 % în 60 de zile. Se prepară o soluție stoc (în apă dezoxigenată) a substanței de referință alese în același mod ca pentru substanța testată și se ajustează la pH 7 ± 0,2, dacă este necesar.

Controlul pentru inhibiție (condițional)

21. Pentru a obține informații privind toxicitatea substanței testate pentru microorganisme anaerobe pentru a găsi cea mai adecvată concentrație de testare, se adaugă substanța testată și substanța de referință într-un vas care conține mediul de testare (a se vedea punctul 16), fiecare la aceleași concentrații ca cele adăugate, respectiv [a se vedea punctele 19 și 20 și, de asemenea, ISO 13641-1 (12)].

▼M6

Nămolul fermentat

22. Se colectează nămol fermentat dintr-un bazin de fermentare al unei stații de tratare a apelor uzate care tratează în special apele uzate menajere. Nămolul trebuie să fie caracterizat complet, iar informațiile de bază aferente trebuie raportate (a se vedea punctul 54). În cazul în care se intenționează utilizarea unui inocul adaptat, poate fi luată în considerare utilizarea de nămol fermentat provenit de la o stație de tratare a apelor uzate industriale. Pentru colectarea nămolului fermentat se utilizează flacoane cu gât larg fabricate din polietilenă cu densitate mare sau dintr-un material similar, care se pot dilata. Se introduce nămol în flacoane până la aproximativ 1 cm distanță de partea lor superioară și se închid ermetic, de preferință cu o supapă de siguranță. După transportul la laborator, nămolul colectat poate fi utilizat direct sau poate fi introdus într-un bazin de fermentare de laborator. Biogazele în exces se eliberează prin deschiderea cu atenție a flacoanelor cu nămol. În mod alternativ, nămolul anaerob cultivat în laborator poate fi utilizat ca sursă de inocul, însă spectrul de activitate al acestuia poate să fi fost redus.

Avertisment – Nămolul fermentat produce gaze inflamabile care prezintă risc de incendiu și de explozie: el conține și organisme potențial patogene, de aceea, trebuie luate măsuri de precauție corespunzătoare în momentul manipulării acestuia. Din motive de siguranță, a se evita utilizarea de vase din sticlă pentru colectarea nămolului.

23. Pentru a reduce producția de gaze de fond și pentru a reduce influența martorilor de control, poate fi luată în considerare fermentarea prealabilă a nămolului. În cazul în care fermentarea prealabilă este necesară, nămolul trebuie să poată fermenta fără adăugarea oricăror nutrienți sau substraturi la 35 °C ± 2 °C timp de maximum 7 de zile. S-a constatat că fermentarea prealabilă timp de aproximativ 5 zile oferă, în mod uzual, o scădere optimă a producției de gaze a martorului fără creșteri inacceptabile ale perioadelor de latență sau de incubare în cursul fazei de testare sau pierdere de activitate în sensul unui număr mai mic de substanțe testate.

24. Pentru substanțele testate care sunt sau care se preconizează că sunt puțin biodegradabile, se ia în considerare preexpunerea nămolului la substanța testată pentru a obține un inocul care este mai bine adaptat. Într-un astfel de caz, substanța testată se adaugă la o concentrație de carbon organic de 5 – 20 mg/l la nămolul digerat și se incubează timp de până la 2 săptămâni. Înainte de utilizare, nămolul preexpus se spală cu grijă (a se vedea punctul 25), iar în raportul privind testul se indică condițiile preexpunerii.

Inoculul

25. Se spală nămolul (a se vedea punctele 22 – 24) chiar înainte de utilizare, pentru a reduce concentrația IC la mai puțin de 10 mg/l în suspensia finală de testat. Se centrifughează nămolul în eprubete închise ermetic (de exemplu, 3 000 g timp de 5 minute) și se elimină supernatantul. Se suspendă granulele rezultate în mediu dezoxigenat (punctele 16, 17), se centrifughează din nou suspensia și se elimină lichidul supernatant. În cazul în care IC nu a fost redusă suficient, procedura de spălare a nămolului se poate repeta de maximum două ori. Aceasta nu pare a avea un efect advers pentru microorganisme. În final, se suspendă granulele din volumul necesar de mediu de testare și se determină concentrația totală a solidelor [de exemplu, ISO 11923 (15)]. Concentrația finală a solidelor totale din vasele de testare trebuie să fie situată în intervalul 1 g/l – 3 g/l (sau aproximativ 10 % din cea a nămolului fermentat nediluat). Operațiunile descrise mai sus se execută astfel încât să se asigure nămolului un contact minim cu oxigenul (de exemplu, se utilizează o atmosferă de azot).

▼M6

PROCEDURA DE TESTARE

26. Se efectuează următoarele proceduri inițiale folosind tehnici pentru a menține contactul dintre nămol fermentat și oxigen la un nivel cât mai mic posibil, de exemplu, poate fi necesar să se utilizeze o cutie cu mănuși într-o atmosferă de azot și/sau să se purjeze flacoanele cu azot (4).

Pregătirea testării substanței de testat și a controalelor

27. Se pregătesc câte cel puțin trei vase de testare (a se vedea punctul 13-b) pentru substanța testată, martorii de control, substanța de referință, controalele pentru inhibiție (condițional) și camerele de control al presiunii (procedură opțională) (a se vedea punctele 7, 19 – 21). Pot fi pregătite, de asemenea, vase suplimentare pentru evaluarea biodegradării primare folosind analize specifice substanței testate. Același set de martori de control poate fi folosit pentru mai multe substanțe testate în cadrul aceluiași test dacă volumele spațiului neumplut sunt concordante.

28. Se prepară inoculul diluat înainte de adăugarea acestuia în vase, de exemplu cu ajutorul unei pipete cu orificiu larg. Se adaugă alicote de inocul bine amestecat (punctul 25) astfel încât concentrația solidelor totale să fie aceeași în toate vasele (între 1 g/l și 3 g/l). Se adaugă soluții stoc ale substanțelor testate și de referință după ajustarea pH-ului la 7 ± 0,2, dacă este necesar. Substanța testată și substanța de referință trebuie să fie adăugate folosind cea mai adecvată cale de administrare (punctul 19).

29. Concentrația de testare a carbonului organic trebuie în mod normal să se situeze în intervalul 20 – 100 mg/l (punctul 4). Dacă substanța testată este toxică, concentrația de testare trebuie să fie redusă la 20 mg C/l sau chiar sub această valoare dacă se măsoară doar biodegradarea primară cu analize specifice. Trebuie remarcat faptul că variabilitatea rezultatelor testului crește la concentrații de testare mai mici

30. Pentru vasele martor, se adaugă o cantitate echivalentă din cărăușul utilizat pentru a doza substanța testată în locul unei soluții, suspensii sau emulsii stoc. Dacă substanța testată a fost administrată folosind filtre cu fibre din sticlă sau solvenți organici, martorilor li se adaugă un filtru sau un volum de solvent echivalent cu cel evaporat. Se pregătește o replică suplimentară cu substanță testată pentru măsurarea valorii pH-ului. Se ajustează pH-ul la 7 ± 0,2, dacă este necesar, cu mici cantități de acid sau alcalin mineral diluat. Aceleași cantități de agenți de neutralizare trebuie adăugate în toate vasele de testare. Aceste adăugiri nu trebuie să fie necesar a fi efectuate deoarece valoarea pH-ului soluțiilor stoc ale substanței testate și ale substanței de referință au fost deja ajustate (a se vedea punctele 19 și 20). Dacă se măsoară biodegradarea primară, trebuie prelevat un eșantion adecvat din vasul de control al pH-ului sau dintr-un vas de testare suplimentar, iar concentrația substanței testate trebuie măsurată folosind analize specifice. În toate vasele pot fi adăugați magneți acoperiți dacă amestecurile de reacție trebuie agitate (opțional).

31. Se asigură că volumul total de lichid V_l și volumul spațiului neumplut V_h au aceleași valori în toate vasele; se notează și se înregistrează V_l și V_h. Fiecare vas trebuie să fie închis ermetic cu un sept impermeabil la gaze și transferat din cutia cu mănuși (a se vedea punctul 26) în incubator (a se vedea punctul 13-a).

▼M6

Substanțele testate insolubile

32. Se adaugă cantități cântărite de substanțe greu solubile în apă direct în vasele pregătite. Dacă este necesară utilizarea unui solvent (a se vedea punctul 19), soluția sau suspensia substanței testate se transferă în vasele goale. Dacă este posibil, solventul se lasă să se evapore trecând azotul gazos prin vase și apoi se adaugă alte ingrediente, și anume, nămol fermentat (punctul 25) și apă dezoxigenată, după necesități. Trebuie să se pregătească, de asemenea, un vas suplimentar de control cu solvent (a se vedea punctul 19). Pentru alte metode de adăugare de substanțe insolubile, se poate consulta ISO 10634 (13). Substanțele testate lichide pot fi dozate cu ajutorul unei seringi în vasele complet pregătite închise ermetic, dacă se preconizează că pH-ul inițial nu va depăși 7 ± 1, în caz contrar se dozează astfel cum este descris mai sus (a se vedea punctul 19).

Incubarea și măsurarea presiunii gazelor

33. Vasele pregătite se lasă la incubat la 35 °C ± 2 °C timp de aproximativ 1 oră pentru a permite echilibrarea și eliberarea gazelor în exces în atmosferă, de exemplu, prin agitarea fiecărui vas pe rând, inserând acul manometrului (punctul 13-c) prin dopul sigilant și deschizând supapa până când manometrul indică valoarea zero. Dacă în această etapă sau în momentul efectuării de măsurători intermediare, presiunea din spațiu neumplut este mai mică decât cea atmosferică, azotul gazos trebuie introdus pentru a restabili presiunea atmosferică. Se închide supapa (a se vedea punctul 13-c) și se continuă incubarea la întuneric, asigurându-se că toate părțile vaselor sunt menținute la temperatura de fermentare. Se observă vasele după incubare timp de 24 – 48 de ore. Vasele se resping în cazul în care conținutul lor prezintă o colorație roz distinctă în lichidul supernatant, de exemplu, dacă resazurinul (a se vedea punctul 16) și-a schimbat culoarea indicând prezența oxigenului (a se vedea punctul 50). În timp ce mici cantități de oxigen pot fi tolerată de către sistem, concentrațiile mai mari pot inhiba semnificativ evoluția biodegradării anaerobe. Respingerea ocazională a unui singur vas dintr-un set de trei vase poate fi acceptată, însă apariția mai multor eșecuri trebuie să conducă la o investigație a procedurilor experimentale, precum și la repetarea testului.

34. Conținutul fiecărui vas se amestecă cu atenție prin agitare timp de câteva minute de cel puțin 2 – 3 ori pe săptămână și imediat înainte de fiecare măsurare a presiunii. Agitarea resuspendă inoculul și asigura echilibrul gazos. Toate măsurătorile trebuie să fie efectuate cu rapiditate, deoarece vasele de testare pot face obiectul unei scăderi a temperaturii, conducând la valori false. În timpul măsurării presiunii, întregul vas de testare inclusiv spațiul neumplut trebuie să fie menținut la temperatura de fermentare. Se măsoară presiunea gazelor, de exemplu, prin inserarea prin sept a acului unei seringi (punctul 13-c) conectat la un aparat de monitorizare a presiunii. Trebuie avută grijă pentru a nu lăsa apa să pătrundă în acul de seringă; dacă acest lucru se întâmplă, părțile umede trebuie uscate și trebuie utilizat un ac nou. Presiunea trebuie să fie măsurată în milibari (a se vedea punctul 42). Presiunea gazelor din vase poate fi măsurată periodic, de exemplu în fiecare săptămână, și, în mod opțional, excesul de gaze este eliminat în atmosferă. Ca alternativă, presiunea este măsurată numai la sfârșitul testului pentru a determina cantitatea de biogaze produsă.

35. Se recomandă citiri intermediare ale presiunii gazelor, întrucât creșterea presiunii oferă orientări privind momentul în care testul poate fi încheiat și permite urmărirea cineticii (a se vedea punctul 6).

▼M6

36. În mod normal, testul trebuie terminat după o perioadă de incubație de 60 de zile cu excepția cazului în care curba biodegradării obținută din măsurarea presiunii a atins faza de platou înainte; aceasta este faza în care a fost atins cel mai înalt grad de biodegradare și în care curba biodegradării s-a stabilizat. Dacă valoarea platoului este sub 60 % interpretarea este problematică deoarece ea indică faptul că numai o parte a moleculei a fost mineralizată sau că s-a comis o eroare. Dacă la sfârșitul perioadei de incubare, se produc gaze, dar faza de platou nu a fost în mod evident atinsă, trebuie luată în considerare prelungirea testului pentru a verifica dacă platoul (> 60 %) va fi atins.

Măsurarea carbonului anorganic

37. La sfârșitul testului după ultima măsurare a presiunii gazelor, nămolul trebuie lăsat să se decanteze. Se deschide fiecare vas pe rând și se prelevează imediat eșantioane pentru determinarea concentrației (mg/l) carbonului anorganic (IC) din lichidul supernatant. Nu trebuie să se recurgă nici la centrifugarea, nici la filtrarea lichidului supernatant, întrucât în acest caz ar exista o pierdere inacceptabilă de dioxid de carbon dizolvat. Dacă lichidul nu poate fi analizat în momentul prelevării de eșantioane, el se depozitează într-un flacon închis ermetic, fără spațiu neumplut și răcit la aproximativ 4 °C timp de 2 zile. După măsurarea IC, se măsoară și se înregistrează valoarea pH-ului.

38. Ca alternativă, IC în supernatant poate fi determinată indirect prin eliberarea IC dizolvat ca dioxid de carbon care poate fi măsurat în spațiul neumplut. După ultima măsurare a presiunii gazelor, se ajustează presiunea în fiecare dintre vasele de testare la presiunea atmosferică. Conținutul fiecărui vas se acidifiază la un pH de aproximativ 1 prin adăugarea de acid mineral concentrat (de exemplu, H_2SO_4) prin septul vaselor închise ermetic. Vasele agitate se incubează la 35 °C ± 2 °C timp de aproximativ 24 de ore și se măsoară presiunea gazelor rezultate din dioxidul de carbon degajat folosind un manometru.

39. Se realizează citiri similare pentru vasele de control corespunzătoare cu martor, cu substanță de referință și, dacă sunt incluse, vasele de control pentru inhibiție (a se vedea punctul 21).

40. În unele cazuri, în special dacă aceleași vase de control sunt utilizate pentru mai multe substanțe testate, măsurătorile concentrațiilor IC intermediare în vasele de testare și în vasele de control trebuie luate în considerare, după caz. În acest caz, trebuie să se pregătească un număr suficient de vase pentru toate măsurătorile intermediare. Această procedură este preferată celei care implică prelevarea tuturor eșantioanelor dintr-un singur vas. Aceasta din urmă se poate realiza numai dacă volumul necesar pentru analiza DIC nu este considerat prea mare. Măsurarea DIC trebuie efectuată după măsurarea presiunii gazelor fără eliberarea gazelor în exces, astfel cum se descrie mai jos:

— se prelevează un volum cât mai mic de eșantioane de supernatant cu o seringă introdusă în sept fără a deschide vasele și se determină IC din eșantion;

— după prelevarea eșantionului, gazele în exces sunt eliberate sau nu;

— trebuie să se țină cont de faptul că chiar și o scădere mică a volumului supernatantului (de exemplu, de aproximativ 1 %) poate conduce la o creștere semnificativă a volumului de gaze în spațiul neumplut (V_h);

— ecuațiile (a se vedea punctul 44) sunt corectate prin creșterea V_h în ecuația 3, după necesități.

▼M6

Analize specifice

41. Dacă trebuie determinată degradarea anaerobă primară (a se vedea punctul 30), se prelevează un volum corespunzător de eșantion pentru analize specifice la începutul și la sfârșitul testului din vasele care conțin substanța testată. Dacă aceasta este realizată, este de remarcat faptul că volumele spațiului neumplut (V_h) și de lichid (V_l) vor fi modificate, acest fenomen trebuind a fi luat în considerate la calcularea rezultatelor producerii de gaze. Ca alternativă, se pot preleva eșantioane pentru analize specifice din amestecuri suplimentare pregătite anterior în acest scop (punctul 30).

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

42. Din considerente practice, presiunea gazelor se măsoară în milibari (1 mbar = 1h Pa = 10^5 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), volumul în litri și temperatura în grade Celsius.

Carbonul din spațiul neumplut

43. Întrucât 1 mol de metan și 1 mol de dioxid de carbon conțin fiecare 12 g de carbon, masa carbonului dintr-un volum dat de gaze degajate poate fi exprimată ca:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ecuația [1]}$$

unde:

m = masa carbonului (mg) într-un volum dat de gaze degajate;

12 = masa atomică relativă a carbonului;

n = numărul de moli de gaz dintr-un volum dat.

Dacă un gaz, altul decât metanul sau dioxidul de carbon (de exemplu, N_2O) este generat în cantități considerabile, formula [1] trebuie modificată pentru a descrie posibilitatea efectelor gazelor generate.

44. Conform legilor gazelor, n poate fi exprimat ca:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ecuația [2]}$$

unde:

p = presiunea gazelor (Pascali);

V = volumul gazului (m^3);

R = constanta molară a gazelor [8,314J/(mol K)];

T = temperatura de incubare (Kelvin).

Prin combinarea ecuațiilor [1] și [2] și raționalizare pentru a ajusta în raport cu producția de gaze în martorul de control:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ecuația [3]} \qquad \text{unde:}$$

m_h = masa de carbon net produs ca gaz în spațiul neumplut (mg);

Δp = media diferențelor dintre presiunea inițială și cea finală în vasele de testare minus media corespunzătoare în vasele martor (milibari);

▼**M6**

V_h = volumul de spațiu neumplut din vas (l);

0,1 = conversia pentru newtoni/m^2 în milibari și m^3 în litri.

Ecuația [4] trebuie utilizată pentru temperatura normală de incubare de 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Ecuația [4]}$$

Notă: Calcularea alternativă a volumului. Citirile manometrului sunt convertite în ml de gaze produse folosind curba standard generată prin trasarea volumului (ml) injectat versus valoarea măsurată (apendicele 2). Numărul de moli (n) de gaz în spațiul neumplut din fiecare vas este calculat prin împărțirea producției cumulate de gaze (ml) la 25 286 ml/mol, care reprezintă volumul ocupat de un mol de gaz la 35 °C și presiunea atmosferică standard. Întrucât 1 mol de CH_4 și 1 mol de CO_2 conține fiecare 12 g de carbon, cantitatea de carbon (mg) din spațiul neumplut (m_h) este dată de ecuația [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Ecuația [5]}$$

Raționalizare pentru a ajusta în raport cu producția de gaze în martorul de control:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Ecuația [6]}$$

unde:

m_h = masa de carbon net produs ca gaz în spațiul neumplut (mg);

ΔV = media diferenței dintre volumul de gaze produse în spațiul neumplut din vasele de testare și din vasele de control martor;

25286 = volumul ocupat de 1 mol de gaz la 35 °C, 1 atmosferă.

45. Evoluția biodegradării poate fi urmărită prin trasarea unei curbe a creşterii presiunii cumulate Δp (milibari) în funcție de timp, dacă este cazul. Din această curbă, se identifică și se înregistrează faza de latență (zile). Faza de latență este intervalul de timp de la începutul testului până la începerea degradării semnificative (de exemplu, a se vedea apendicele 3). Dacă au fost prelevate și analizate eșantioane intermediare de supernatant (a se vedea punctele 40, 46 și 47), atunci C total produs (în gaze plus în lichid) poate fi trasat grafic în loc de a trasa doar presiunea cumulată.

Carbonul din lichid

46. Cantitatea de metan din lichid este ignorată întrucât solubilitatea sa în apă este cunoscută ca fiind foarte mică. Masa carbonului anorganic din lichidul din vasele de testare se calculează folosind ecuația [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Ecuația [7]}$$

unde:

m_l = masa de carbon anorganic din lichid (mg);

C_{net} = concentrația de carbon anorganic din vasele de testare minus cea din vasele de control la sfârșitul testului (mg/l);

V_l = volumul de lichid din vas (l).

▼M6

Carbon gazificat total

47. Masa totală a carbonului gazificat din vas se calculează folosind ecuația [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Ecuația [8]}$$

unde:

m_t = masa totală a carbonului gazificat (mg);

m_h și m_l sunt definite mai sus.

Carbonul din substanța testată

48. Masa de carbon din vasul de testare derivat din substanța testată adăugată se calculează folosind ecuația [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Ecuația [9]}$$

unde:

m_v = masa carbonului din substanța testată (mg);

C_c = concentrația carbonului din substanța testată din vasul de testare (mg/l)

V_l = volumul de lichid din vasul de testare (l).

Amploarea biodegradării

49. Procentul de biodegradare a gazelor din spațiul neumplut se calculează folosind ecuația [10], iar procentul total al biodegradării se calculează folosind ecuația [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Ecuația [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Ecuația [11]}$$

unde:

D_h = biodegradarea gazelor din spațiul neumplut (%);

D_t = biodegradarea totală (%);

m_h, m_v și m_t sunt definite mai sus.

Amploarea biodegradării primare este calculată din (opțional) măsurătorile concentrației substanței testate la începutul și sfârșitul incubării, utilizând ecuația [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Ecuația [12]}$$

unde:

D_p = degradarea primară a substanței testate (%);

S_i = concentrația inițială a substanței testate (mg/l);

S_e = concentrația substanței testate la sfârșit (mg/l).

Dacă metoda de analiză indică concentrații semnificative ale substanței testate în inoculul de nămol anaerob nemodificat, se folosește ecuația [13]:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{Ecuația [13]}$$

unde:

$D_p^{\ 1}$ = degradarea primară corectată a substanței testate (%);

S_{ib} = concentrația inițială „aparentă” a substanței testate în martorii de control (mg/l);

S_{eb} = concentrația „aparentă” a substanței testate în controalele martor la final (mg/l).

Validitatea rezultatelor

50. Citirile presiunii trebuie utilizate numai din vasele care nu prezintă o colorație roz (a se vedea punctul 33). Contaminarea cu oxigen este redusă la minimum prin utilizarea unor tehnici de manipulare anaerobe corespunzătoare.

51. Trebuie să se aibă în vedere faptul că testul este valid dacă substanțele de referință ating un platou ce reprezintă biodegradare peste 60 % ([1]).

52. Dacă la sfârșitul testului pH-ul a depășit intervalul de 7 ± 1 și dacă a avut loc o biodegradare insuficientă, testul se repetă cu o capacitate de tamponare crescută a mediului.

Inhibarea degradării

53. Producerea de gaze în vasele care conțin atât substanțe testată, cât și substanțe de referință, trebuie să fie cel puțin egală cu cea din vasele care conțin numai substanțe de referință; în caz contrar, se indică inhibarea producerii de gaze. În unele cazuri, producția de gaze în vasele care conțin substanța testată fără substanță de referință va fi mai mică decât cea din martorii de control, indicând faptul că substanța testată este inhibitoare.

Raportul privind testul

54. Raportul privind testul trebuie să includă următoarele informații:

Substanța testată:

— denumire comună, denumire chimică, număr CAS, formulă structurală și proprietăți fizico-chimice relevante;

— puritatea (impurități) substanței testate.

Condiții de testare:

— volumele lichidului fermentat diluat (V_l) și al spațiului neumplut (V_h) din vas;

— descrierea vaselor de testare, a principalelor caracteristici ale măsurării biogazelor (de exemplu, tipul de manometru) și a analizorului IC;

— aplicarea substanței testate și a substanței de referință la sistemul de testare: concentrațiile de testare utilizate și utilizarea oricăror solvenți;

— detalii privind inoculul utilizat: denumirea stației de tratare a apelor uzate, descrierea sursei apelor uzate tratate (de exemplu, temperatura de operare, timpul de retenție a nămolului, în cea mai mare parte din apele uzate menajere), concentrația, orice informație necesară pentru a confirma acestea și informații privind orice pretratament al inoculului (de exemplu, prefermentare, preexpunere);

— temperatura de incubare;

— numărul de replici.

([1]) Aceasta necesită reevaluare dacă sunt incluse substanțe chimice absorbante și insolubile.

▼**M6**

Rezultate:

— valorile pH și IC la sfârșitul testului;

— concentrația substanței testate la începutul și la sfârșitul testului, dacă a fost efectuată o măsurare specifică;

— toate datele măsurate colectate pentru vasele cu substanță testată, martor, substanță de referință și de control pentru inhibiție, după caz [de exemplu, presiunea în milibari, concentrația de carbon anorganic (mg/l) sub formă de tabel (datele măsurate pentru spațiul neumplut și lichid trebuie raportate separat;]

— tratarea statistică a datelor, durata testului și o diagramă a biodegradării substanței testate, a substanței de referință și a controlului inhibiției;

— procentul biodegradării substanței testate și a substanței de referință;

— motivele oricărei respingeri a rezultatelor testului;

— discutarea rezultatelor.

BIBLIOGRAFIE

(1) The following chapters of this Annex:

C.4, Determination of Ready Biodegradability;

C.9, Biodegradation – Zahn-Wellens Test;

C.10, Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment:

A: Activated Sludge Units, B: Biofilms

C.11, Biodegradation – Activated sludge respiration inhibition

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

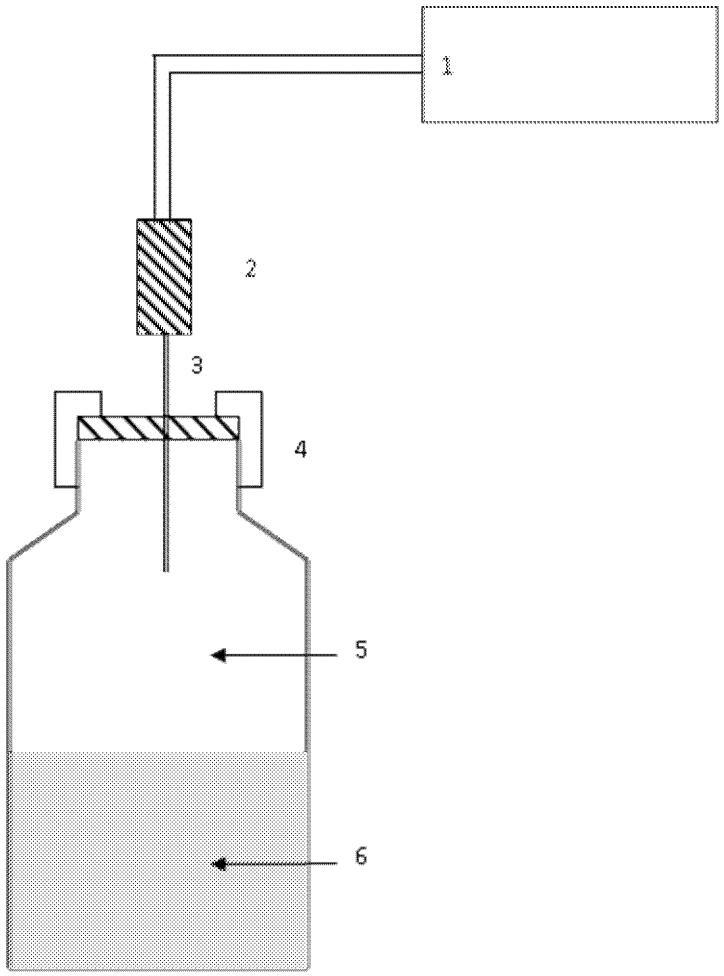
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Apendicele 1

Exemplu de aparatură de măsurare a producerii de gaze prin presiunea gazelor



Legendă:

1 – Manometru

2 – Supapă etanșă pentru gaze cu trei căi

3 – Ac de seringă

4 – Capac etanș pentru gaze (dop ambutisat și sept)

5 – Spațiu neumplut (V_h)

6 – Inocul de nămol fermentat (V_I)

Vase de testare într-un mediu cu o temperatură de 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Apendicele 2

Conversia manometrului

Citirile manometrului pot fi raportate la volumele de gaze cu ajutorul unei curbe standard realizate prin injectarea de volume de aer cunoscute la 35 °C ± 2 °C în flacoane pentru ser care conțin un volum de apă egal cu cel al amestecului de reacție, V_R:

— Se repartizează alicote V_R ml de apă, ținute la temperatura de 35 °C ± 2 °C în cinci flacoane pentru ser. Se sigilează flacoanele și se așează într-o baie de apă la temperatura de 35 °C timp de 1 oră pentru echilibrare;

— Se pornește manometrul, se lasă să se stabilizeze și se ajustează la zero;

— Se introduce acul seringii prin septul unuia dintre flacoane, se deschide supapa până ce manometrul afișează valoarea zero și se închide supapa;

— Se repetă procedura cu restul flacoanelor;

— Se injectează 1 ml de aer la temperatura de 35 °C ± 2 °C în fiecare flacon. Se introduce acul (pe manometru) prin septul unuia dintre flacoane și se așteaptă stabilizarea presiunii. Se înregistrează presiunea, se deschide supapa până ce presiunea este zero și apoi se închide supapa;

— Se repetă procedura cu restul flacoanelor;

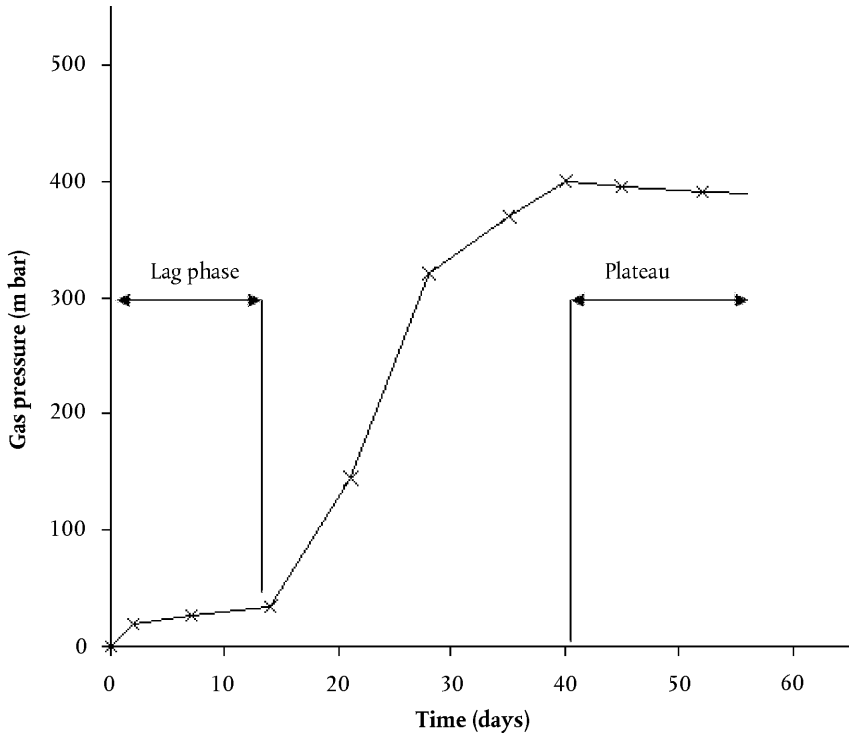
— Se repetă întreaga procedură de mai sus utilizând 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml și 50 ml de aer;

— Se trasează o curbă de conversie a presiunii (Pa) în funcție de volumul de gaz injectat Vb (ml). Răspunsul instrumentului este linear în intervalul 0 Pa – 70 000 Pa și 0 ml – 50 ml de producție de gaze.

▼**M6**

Apendicele 3

Exemplu de curbă de degradare (creștere cumulativă a presiunii nete)



▼M6

Apendicele 4

Exemplu de fișe de date pentru testul de biodegradare anaerobă – fișă de date pentru substanța testată

Laborator: ..... Substanța testată: ..... Test nr.: .....

Temperatură de testare (°C): ..... Volumul spațiului neumplut (V_h): .....(l) Volumul de lichid (V_l): .....(l)

Carbon în substanța testată $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Ziua	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) medie (mbar)	p_4 (martor) (mbar)	p_5 (martor) (mbar)	p_6 (martor) (mbar)	p (martor) medie (mbar)	p (net) test – martor medie (mbar)	Δp (net) Cumulat (mbar)	m_h spațiu neumplut C [2] (mg)	D_h Biodegradare [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ test (mg)	$C_{IC,\ 2}$ test (mg)	$C_{IC,\ 3}$ test (mg)	C_{IC} media pentru test (mg)	$C_{IC,\ 4}$ martor (mg)	$C_{IC,\ 5}$ martor (mg)	$C_{IC,\ 6}$ martor (mg)	C_{IC} media pentru martor (mg)	$C_{IC,\ net}$ test – martor medie (mg)	m_l lichid C [4] (mg)	m_t C total [5] (mg)	D_t Biodegradare [6] (%)
IC (sfârșit)												
pH (sfârșit)												

[1] Carbon în vasul de testare, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

[2] Carbon în spațiul neumplut, m_h (mg) la temperatură de incubare normală (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

[3] Biodegradarea calculată din gazele din spațiul neumplut, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

[4] Carbon în lichid, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

[5] Carbon gazificat total, mt (mg): $m_t + m_l$

[6] Biodegradarea totală, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — RO — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laborator: ..... Substanță de referință: ..... Test nr.: .....

Temperatură de testare (°C): ..... Volumul spațiului neumplut (V_h): .....(l) Volumul de lichid (V_l) (litri): .....

Carbon în substanța de referință $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v [1] (mg):

Ziua	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) medie (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) medie (mbar)	p (ref.) ref. – martor (mbar)	Δp (ref.) cumulativ (mbar)	m_h spațiu neumplut C [2] (mg)	D_h Biodegradare [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} medie ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} medie inhib. (mg)	$C_{IC,\ net}$ ref. – inhib. (mg)	m_l lichid C [4] (mg)	m_t C total [5] (mg)	D_t Biodegradare [6] (%)
IC (sfârșit)												
pH (sfârșit)												

([1]) Carbon în vasul de testare, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Carbon în spațiul neumplut, m_h (mg) la temperatură de incubare normală (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
([3]) Biodegradarea calculată din gazele din spațiul neumplut, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Carbon în lichid, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Carbon gazificat total, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Biodegradarea totală, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

C.44. PERCOLARE ÎN COLOANE DE SOL

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 312 (2004). Substanțele chimice sintetice pot ajunge în sol direct prin aplicare deliberată (de exemplu, substanțe agrochimice) sau prin căi indirecte (de exemplu, prin ape reziduale nămol de epurare sol sau aer depuneri umede/uscate). Pentru evaluarea riscului acestor substanțe chimice, este important să se estimeze potențialul lor de transformare în sol și de migrare (percolare) în straturile mai profunde ale solului și, în cele di urmă, în apele subterane.

2. Mai multe metode sunt disponibile pentru a măsura potențialul de percolare al substanțelor chimice în sol în condiții de laborator controlate și anume cromatografie în strat subțire de sol, cromatografie în strat gros de sol, cromatografie în coloană de sol și măsurători ale adsorbției – desorbției (1) (2). Pentru substanțele chimice neionizate, coeficientul de partiție n-octanol-apă (P_{ow}) permite o estimare timpurie a potențialului lor de absorbție și de percolare (3)(4)(5).

3. Metoda descrisă în această metodă de testare se bazează pe cromatografie în coloană de sol cu sol perturbat (a se vedea apendicele 1 pentru definiție). Se efectuează două tipuri de experimente pentru a determina (i) potențialul de percolare al substanței testate și (ii) potențialul de percolare al produșilor de transformare (studiu cu reziduuri învechite) în soluri în condiții de laborator controlate ([1]). Metoda de testare se bazează pe metodele existente (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. Numărul și tipul solurilor utilizate în cadrul acestei metode de testare au fost convenite cu ocazia unui atelier de lucru al OCDE privind selectarea solului/sedimentelor, care a avut loc la Belgirate, Italia, în 1995 (12). De asemenea, el a formulat o serie de recomandări cu privire la colectarea, manipularea și depozitarea eșantioanelor de sol pentru experimente de percolare.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

5. Coloane fabricate din material inert adecvat (de exemplu, sticlă, oțel inoxidabil, aluminiu, teflon, PVC etc.) sunt umplute cu sol și apoi saturate și echilibrate cu o soluție de „ploaie artificială” (pentru definiție a se vedea apendicele 1) și se lasă să se dreneze. Ulterior, suprafața fiecărei coloane de sol este tratată cu substanța chimică testată și/sau cu reziduuri învechite ale substanței chimice testate. Apoi ploaia artificială este aplicată în coloanele de sol și se colectează percolatul. După procesul de percolare, solul este eliminat din coloane și este secționat într-un număr corespunzător de segmente în funcție de informațiile urmărite prin studiu. Fiecare segment de sol și percolatul sunt apoi analizate în ceea ce privește substanța chimică testată și, dacă este cazul, produșii de transformare sau alte substanțe chimice de interes.

APLICABILITATEA METODEI DE TESTARE

6. Metoda de testare este aplicabilă pentru testarea substanțelor chimice (nemarcate sau marcate radioactiv: de exemplu cu ^{14}C) pentru care există o metodă analitică cu acuratețe și sensibilitate suficiente. Metoda de testare nu trebuie să se aplice substanțelor chimice care sunt volatile din sol și apă și, prin urmare, care nu rămân în sol și/sau în percolat în condițiile experimentale ale acestei metode de testare.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ TESTATĂ

7. Substanțele chimice testate nemarcate sau marcate radioactiv pot fi folosite pentru a măsura comportamentul de percolare în coloanele de sol. Materialele marcate radioactiv sunt necesare pentru a studia percolarea produșilor de transformare (reziduuri învechite ale substanței chimice testate) și pentru a determina bilanțul masic. Este recomandată marcarea

([1]) Studiile percolării în coloană cu produse fitosanitare pot furniza informații legate de mobilitate cu privire la o substanță chimică testată și la produșii ei de transformare și poate completa studiile de absorbție cu loturi.

▼**M6**

cu ^{14}C, dar pot fi utili și alți izotopi precum ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Pe cât posibil, marcarea ar trebui făcută în porțiunea sau porțiunile cele mai stabile ale moleculei. Puritatea substanței chimice testate trebuie să fie de cel puțin 95 %.

8. Cele mai multe substanțe chimice trebuie să fie aplicate ca substanță unică. Cu toate acestea, în cazul substanțelor active din produsele fitosanitare, pot fi utilizate produse formulate pentru a studia percolarea substanței testate parentale, însă testarea lor este necesară în special atunci când amestecul poate afecta viteza de eliberare (de exemplu, formulările granulare sau cu eliberare controlată). În ceea ce privește cerințele specifice amestecurilor pentru protocolul de testare, ar putea fi utilă consultarea autorității de reglementare înainte de efectuarea testului. Pentru studiile percolării reziduurilor învechite, trebuie utilizată substanța testată parentală pură.

9. Înainte de efectuarea unor teste de percolare în coloanele de sol, este de preferat să fie disponibile următoarele informații privind substanța chimică testată:

(1) solubilitatea în apă [metoda de testare A.6] (13);

(2) solubilitatea în solvenți organici;

(3) presiunea de vapori [metoda de testare A.4] (13) și constanta legii lui Henry;

(4) coeficientul de partiție n-octanol/apă [metodele de testare A.8 și A.24] (13);

(5) coeficientul de absorbție (K_d, K_f sau K_{OC}) [metodele de testare C.18 și/sau C.19] (13);

(6) hidroliza [metoda de testare C.7] (13);

(7) constanta de disociere (pK_a) [OCDE TG 112] (25);

(8) transformarea aerobă și anaerobă în sol [metoda de testare C.23] (13)

Notă: Temperatura la care au fost efectuate aceste măsurători trebuie raportată în rapoartele respective privind testele.

10. Cantitatea de substanță chimică testată aplicată coloanelor de sol trebuie să fie suficientă pentru a permite detectarea a cel puțin 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment. Pentru substanțele chimice active din produsele fitosanitare, cantitatea de substanță chimică testată aplicată poate corespunde ratei de utilizare recomandate maxime (o singură aplicare).

11. Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică adecvată cu acuratețe, precizie și sensibilitate cunoscute, pentru a cuantifica substanța chimică testată și, dacă este relevant, produșii ei de transformare în sol și în percolat. De asemenea, ar trebui să fie cunoscută limita de detecție analitică pentru substanța chimică testată și pentru produșii ei de transformare semnificativi (în mod normal, cel puțin toți produșii de transformare ≥10 % din doza aplicată observați în studiile privind căile de transformare, dar de preferință, orice produs de transformare relevant de interes) (a se vedea punctul 17).

▼M6

SUBSTANȚELE CHIMICE DE REFERINȚĂ

12. Substanțele chimice de referință cu un comportament de percolare cunoscut, precum atrazina sau monuronul, care pot fi considerați percolatori moderați în teren trebuie folosite pentru a evalua mobilitatea relativă în sol a substanței chimice testate (1)(8)(11). O substanță chimică de referință polară neabsorbantă și nedegradabilă (de exemplu, tritiu, bromură, fluoresceină, eozină) pentru a trasa mișcarea apei în coloană poate, de asemenea, să fie utilă pentru confirmarea proprietăților hidrodinamice ale coloanei de sol.

13. Substanțele chimice standard analitice pot fi, de asemenea, utile pentru caracterizarea și/sau identificarea produșilor de transformare găsiți în segmentele de sol și în segmentele de percolat prin metode cromatografice, spectroscopice sau prin alte metode relevante.

DEFINIȚII ȘI UNITĂȚI

14. A se vedea apendicele 1.

CRITERII DE CALITATE

Recuperarea

15. Suma procentelor de substanță chimică testată găsite în segmentele de sol și în percolatul din coloană după percolare redă recuperarea pentru un experiment de percolare. Recuperările trebuie să varieze între 90 % și 110 % pentru substanțele chimice marcate radioactiv (11) și între 70 % și 110 % pentru substanțele chimice nemarcate (8).

Repetabilitatea și sensibilitatea metodei analitice

16. Repetabilitatea metodei analitice pentru a cuantifica substanța chimică testată și produșii de transformare pot fi verificate prin analize duplicat a aceluiași extract dintr-un segment de sol sau din percolat (a se vedea punctul 11).

17. Limita de detecție (*limit of detection* – LOD) a metodei de analiză pentru substanța chimică testată și pentru produșii de transformare trebuie să fie de cel puțin 0,01 mg · kg^{-1} în fiecare segment de sol sau în percolat (ca substanță chimică testată) sau 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment, oricare dintre acestea este mai mică. Se specifică și limita de cuantificare (*limit of quantification* – LOQ).

DESCRIEREA METODEI DE TESTARE

Sistemul de testare

18. Coloanele de percolare (secționabile sau nesecționabile) fabricate din material inert adecvat (de exemplu, sticlă, oțel inoxidabil, aluminiu, teflon, PVC etc.), cu un diametru interior de cel puțin 4 cm și o înălțime minimă de 35 cm sunt utilizate pentru test. Materiale coloanei trebuie să fie testate din punctul de vedere al potențialelor interacțiuni cu substanța chimică testată și/sau cu produșii ei de transformare. Exemple de coloane secționabile sau nesecționabile adecvate sunt prezentate în apendicele 2.

19. Pentru umplerea coloanelor de sol se folosesc cupe, plonjoare și vibratoare.

20. Pentru aplicarea ploii artificiale în coloanele de sol, pot fi utilizate pompe cu piston sau peristaltice, capete de duș, flacoane Mariotte sau simple pâlnii de picurare.

▼M6

Echipamente de laborator și substanțe chimice

21. Este necesar echipament de laborator standard, care să cuprindă, în particular, următoarele:

(1) instrumente de analiză cum sunt: echipamente pentru GLC, HPLC și TLC, inclusiv sisteme adecvate de detecție pentru analiza substanțelor marcate radioactiv și a celor nemarcate sau metoda diluției izotopice inverse;

(2) instrumente de identificare (de exemplu MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR etc.);

(3) contor cu lichid de scintilație pentru substanțele chimice marcate radioactiv;

(4) oxidant pentru combustia materialelor marcate;

(5) aparat de extracție (de exemplu eprubete de centrifugare pentru extracția la rece și aparat Soxhlet pentru extracția continuă sub reflux);

(6) instrumente pentru concentrarea soluțiilor și a extractelor (de exemplu, evaporator rotativ);

22. Substanțele chimice utilizate includ: solvenți organici, reactivi de puritate analitică, precum acetona, metanolul etc.; lichid de scintilație; soluție 0,01 M $CaCl_2$ în apă distilată sau deionizată (= ploaie artificială).

Substanța chimică testată

23. Pentru a aplica substanța chimică testată în coloana de sol, aceasta trebuie dizolvată în apă (deionizată sau distilată). Dacă substanța chimică testată este puțin solubilă în apă, acesta poate fi aplicată fie ca produs formulat (dacă este necesar, după suspendare sau emulsifiere în apă), fie în orice solvent organic. În cazul în care se utilizează un solvent organic, acesta trebuie să fie utilizat la minimum și trebuie evaporat de pe suprafața coloanei de sol înainte de a începe procedura de percolare. Formulările solide, precum granulele, trebuie să fie aplicate sub formă solidă fără apă; pentru a permite o mai bună distribuție pe suprafața coloanei de sol, produsul formulat poate fi amestecat cu o cantitate mică de nisip de cuarț (de exemplu 1 g) înainte de aplicare.

24. Cantitatea de substanță chimică testată aplicată coloanelor de sol trebuie să fie suficientă pentru a permite detectarea a cel puțin 0,5 % din doza aplicată într-un singur segment. Pentru substanțele chimice active din produsele de protecție a plantelor, aceasta poate fi bazată pe rata de utilizare maximă recomandată (o singură rată de aplicare) și, atât pentru percolarea substanței parentale, cât și a celei învechite, trebuie să fie raportată la aria suprafeței coloanei de sol utilizate ([1]).

Substanța chimică de referință

25. O substanță chimică de referință trebuie să fie utilizată în experimente de percolare (a se vedea punctul 12). Ea trebuie să fie aplicată pe suprafața coloanei de sol într-un mod similar cu cel al substanței chimice testate și la

([1]) Cantitatea care trebuie aplicată pe coloanele de sol cilindrice poate fi calculată folosind următoarea formulă:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

unde:

M = cantitatea aplicată pentru fiecare coloană [µg]

A = rata de aplicare [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = diametrul coloanei de sol [cm]

π = 3,14

▼M6

o rată corespunzătoare care să permită detectarea adecvată fie ca standard intern împreună cu substanța chimică testată pe aceeași coloană de sol, fie singură pe o coloană de sol separată. De preferință, ambele substanțe chimice trebuie să fie aplicate în aceeași coloană, cu excepția cazului când ambele substanțe chimice sunt marcate în mod similar.

Soluri

Selectarea solurilor

26. Pentru studiile de percolare cu substanța chimică testată parentală trebuie utilizate 3 – 4 soluri cu pH-uri, conținut de carbon organic și textură diferite (12). Orientări privind selectarea solurilor pentru experimentele de percolare sunt furnizate în tabelul 1 de mai jos. Pentru substanțele chimice testate ionizabile, solurile selectate trebuie să aibă o gamă largă de pH-uri, pentru a evalua mobilitatea substanței chimice în formele sale ionizate și neionizate; cel puțin 3 soluri trebuie să aibă un pH la care substanța chimică testată este în forma sa mobilă.

Tabelul 1

Orientări privind selectarea solurilor pentru studiile percolării

Solul nr.	Valoarea pH-ului	Carbon organic %	Conținut de argilă %	Textură (*)
1	> 7,5	3,5 – 5	20 – 40	lut argilos
2	5,5 – 7	1,5 – 3	15 – 25	lut mâlos
3	4 – 5,5	3 – 4	15 – 30	lut
4	< 4 – 6 §	< 0,5 – 1,5 § ‡	< 10 – 15 §	nisip lutos
5	< 4,5	> 10 #	< 10	nisip lutos/nisip

(*) Conform sistemelor FAO și USDA (14).

§ Este de preferat ca variabilele respective să prezinte valori în intervalul dat. Dacă, totuși, apar dificultăți în găsirea unui sol corespunzător, se acceptă valori mai mici decât minimumul indicat.

‡ Solurile cu un conținut de carbon organic mai mic de 0,3 % pot perturba corelația dintre conținutul de substanțe organice și adsorbție. Astfel, se recomandă utilizarea de soluri cu un conținut minimum de carbon organic de 0,3 %.

Solurile cu un conținut de carbon foarte mare (de exemplu > 10 %) nu pot fi acceptate legal, de exemplu, în scopul înregistrării pesticidelor.

27. Alte tipuri de sol pot fi uneori necesare pentru a reprezenta regiunile mai reci, temperate și tropicale. Prin urmare, în cazul în care sunt preferate alte tipuri de sol, ele trebuie să se caracterizeze prin aceeași parametri și trebuie să aibă variații similare ale proprietăților ca cele descrise în orientările privind selectarea solurilor pentru studiile de percolare (a se vedea tabelul 1 de mai sus), chiar dacă ele nu îndeplinesc perfect criteriile respective.

28. Pentru studii de percolare cu „reziduuri învechite” trebuie utilizat un singur tip de sol (12). Acesta trebuie să aibă un conținut de nisip > 70 % și un conținut de carbon organic între 0,5 – 1,5 % (de exemplu, solul nr. 4 din tabelul 1). Poate fi necesară utilizarea mai multor tipuri de soluri dacă datele privind produșii de transformare sunt semnificative.

29. Toate solurile trebuie să fie caracterizate cel puțin din punctul de vedere al texturii [% nisip, % mâl, % argilă în conformitate cu sistemele de clasificare FAO și USDA (14)], al pH-ului, al capacității de schimb de cationi, al conținutului de carbon organic, al densității în vrac (pentru sol perturbat) și al capacității de reținere a apei. Măsurarea biomasei microbiene este

▼M6

necesară numai pentru solul care este utilizat în perioada de învechire/incubare efectuată înainte de experimentul de percolare a substanței învechite. Informații privind proprietățile suplimentare ale solului (de exemplu, clasificarea solului, mineralogia argilei, aria suprafeței specifice) for fi utile pentru interpretarea rezultatelor acestui studiu. Pentru determinarea caracteristicilor solului se pot utiliza metodele recomandate în referințele (15)(16)(17)(18)(19).

Colectarea și depozitarea solurilor

30. Solurile trebuie prelevate din stratul superior (orizont A) de la o adâncime maximă de 20 cm. Resturile de vegetație, macrofauna și pietrele trebuie eliminate. Solurile (cu excepția celor utilizate pentru a învechirea substanței chimice testate) sunt uscate cu aer la temperatura camerei (de preferință între 20 – 25 °C). Dezagregarea se realizează cu o forță minimă, astfel încât structura originală a solului să se modifice cât se poate de puțin. Solurile se cern printr-o sită de ≤ 2 mm. Se recomandă omogenizarea atentă, deoarece aceasta crește reproductibilitatea rezultatelor. Înainte de utilizare, solurile pot fi depozitate la temperatura ambiantă și se mențin uscate cu aer (12). Nu există recomandate limite temporale de depozitare, dar solurile depozitate mai mult de 3 ani trebuie analizate din nou înaintea utilizării pentru determinarea conținutului de carbon organic și a pH-ului.

31. Trebuie furnizate informații detaliate privind istoricul locurilor din care se prelevează solul testat. Aceste detalii includ localizarea exactă [exact stabilită cu ajutorul UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) sau a coordonatelor geografice], acoperirea vegetală, tratamentele cu produsele fitosanitare, cu îngrășăminte organice și anorganice, adaosurile de material biologic sau contaminările accidentale (12). Dacă solul a fost tratat cu substanța testată sau cu substanțe cu structură analogă pe parcursul precedenților patru ani, aceste soluri nu trebuie să fie utilizate în studii de percolare.

Condițiile de testare

32. În cursul perioadei de testare, coloanele de sol percolante trebuie ținute la întuneric la temperatură ambientală atâta timp cât această temperatură este menținută într-un interval de ± 2 °C. Temperaturile recomandate sunt între 18 și 25 °C.

33. Ploaia artificială (0,01 M $CaCl_2$) trebuie aplicată în mod continuu pe suprafața coloanelor de sol cu o rată de 200 mm în 48 de ore ([1]); această rată este echivalentă cu aplicare a 251 ml într-o coloană cu un diametru interior de 4 cm. Dacă testul impune, pot fi utilizate și alte rate de ploaie artificială și durate mai lungi.

Efectuarea testului

Percolare cu substanță chimică testată parentală

34. Coloane de percolare cel puțin în duplicat sunt umplute cu sol netratate, uscat cu aer și cernut (< 2 mm) până la o înălțime de aproximativ 30 cm. Pentru a obține o umplere uniformă, solul se adaugă la coloanele în porții mici cu ajutorul unei cupe și este presat cu ajutorul unui plonjon cu vibrare simultană ușoară a coloanei până când partea superioară a coloanei de sol

([1]) Aceasta simulează o ploaie extrem de voluminoasă. Media precipitațiilor anuale, de exemplu, în Europa Centrală este de ordinul a 800 – 1 000 mm.

▼M6

nu mai coboară. Umplerea uniformă este necesară pentru a obține rezultate reproductibile din coloana de percolare. Pentru detalii privind tehnicile de umplere a coloanei, a se vedea referințele (20)(21) și (22). Pentru a controla reproductibilitatea procedurii de umplere, se determină greutatea totală a solului umplut în coloane ([1]); greutățile coloanelor duplicat trebuie să fie similare.

35. După umplere, coloanele de sol sunt preumezite cu ploaie artificială (0,01 M $CaCl_2$) de jos în sus, pentru a înlocui aerul din porii solului cu apă. Apoi coloanele de sol sunt lăsate să se echilibreze, iar excesul de apă este eliminat prin efectul gravității. Metodele de saturație a coloanei sunt revizuite în referința (23).

36. Apoi substanța chimică testată și/sau de referință este aplicată pe coloana de sol (a se vedea, de asemenea, punctele 23 – 25). Pentru a obține o distribuție omogenă, soluțiile, suspensiile sau emulsiile substanței chimice testate și/sau de referință trebuie aplicate uniform pe suprafața coloanei de sol. În cazul în care pentru aplicarea unei substanțe chimice testate se recomandă încorporarea în sol, aceasta trebuie să fie amestecată cu o cantitate mică (de exemplu 20 g) de sol și adăugată la suprafața coloanei de sol.

37. Suprafețele coloanelor de sol sunt acoperite cu un disc sinterizat de sticlă, perle de sticlă, filtre din fibră de sticlă sau hârtie de filtru rotundă pentru a distribui ploaia artificială în mod uniform pe toată suprafața și pentru a evita perturbarea suprafeței solului de către picăturile de ploaie. Cu cât este mai mare diametrul coloanei, cu atât este nevoie de mai multă atenție pentru aplicarea ploii artificiale pe coloanele de sol pentru a asigura o distribuție uniformă a ploii artificiale pe suprafața solului. Apoi, ploaia artificială este adăugată la coloana de sol picătură cu picătura cu ajutorul unui piston sau al unei pompe peristaltice sau a unei pâlnii de picurare. De preferință, percolatul trebuie să fie colectat în fracțiuni, iar volumele lor respective sunt înregistrate ([2]).

38. După percolare și lăsarea coloanelor să dreneze, coloanele de sol sunt secționate într-un număr corespunzător de segmente în funcție de informațiile necesar a fi obținute din studiu, segmentele sunt extrase cu solvenți adecvați sau cu amestecuri de solvenți adecvate și analizate din punctul de vedere al substanței chimice testate și, dacă este cazul, al produșilor de transformare, al radioactivității totale si al substanței chimice de referință. Percolatul sau fracțiunile de percolat sunt analizate direct sau după extracție din punctul de vedere al acelorași produși. Atunci când se utilizează substanțe chimice testate marcate radioactiv, trebuie identificate toate fracțiunile care conțin ≥ 10 % din radioactivitatea aplicată.

Percolare cu reziduuri învechite

39. Solul proaspăt (care nu a fost uscat anterior cu aer) este tratat la o rată corespunzătoare ariei suprafeței coloanelor de sol (a se vedea punctul 24) cu substanța chimică testată marcată radioactiv și incubat în condiții aerobe în conformitate cu metoda de testare C.23 (13). Perioada de incubare (învechire) trebuie să fie suficient de lungă pentru a produce cantități semnificative de produși de transformare; este recomandată o perioadă de învechire

([1]) Exemple de densități brute pentru solurile perturbate sunt după cum urmează:pentru un sol nisipos 1,66 $g \cdot ml^{-1}$
pentru un sol lutos 1,17 $g \cdot ml^{-1}$
pentru un sol lutos nisipos 1,58 $g \cdot ml^{-1}$
pentru un sol mâlos 1,11 $\cdot$ g ml^{-1}

([2]) Volumele de percolat tipice variază între 230 – 260 ml corespunzând la aproximativ 92 – 104 % din ploaia artificială totală aplicată (251 ml) atunci când se utilizează coloane de sol cu diametru de 4 cm și lungime de 30 cm.

▼M6

de un timp de înjumătățire a substanței chimice testate ([1]), dar nu trebuie să depășească 120 zile. Înainte de percolare, solul învechit este analizat în ceea ce privește substanța chimică testată și produșii ei de transformare.

40. Coloanele de percolare sunt umplute până la o înălțime de 28 cm cu același sol (dar uscat cu aer) ca cel utilizat în experimentul de învechire astfel cum este descris la punctului 34, determinându-se și greutatea totală a coloanelor de sol umplute. Ulterior coloanele de sol sunt preumezite astfel cum se descrie la punctul 35.

41. Apoi substanța chimică testată și produșii ei de transformare se aplică pe suprafața coloanelor de sol sub formă de reziduuri de sol învechite (a se vedea punctul 39) ca segment de sol de 2 cm. Este de preferat ca înălțimea totală a coloanelor de sol (sol netratat + sol învechit) să nu depășească 30 cm (a se vedea punctul 34).

42. Percolarea se realizează astfel cum se descrie la punctul 37.

43. După percolare, segmentele de sol și percolatele sunt analizate astfel cum se indică la punctul 38 din punctul de vedere al substanței chimice testate, al produșilor ei de transformare și al radioactivității neextrase. Pentru a se determina cantitatea de reziduuri învechite reținută în stratul superior de 2 cm după percolare, acest segment trebuie analizat separat.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

44. Cantitățile de substanță chimică testată, de produși de transformare, neextractabili și, dacă este inclusă, de substanță chimică de referință trebui să fie exprimate în % din doza inițială aplicată pentru fiecare segment de sol și fracțiune de percolat. Trebui realizată o prezentare grafică pentru fiecare coloană, raportând procentele constatate la adâncimea solului.

45. Atunci când o substanță chimică de referință este inclusă în aceste studii de percolare pe coloană, percolarea unei substanțe chimice să poată fi evaluată pe o scară relativă utilizând factorii de mobilitate relativă (*relative mobility factors* – RMF; pentru definiție, a se vedea apendicele 3) (1)(11) care permite compararea datelor referitoare la percolare a unor diverse substanțe chimice obținute cu diferite tipuri de sol. Exemple de valori RMF pentru o varietate de substanțe chimice fitosanitare sunt oferite în apendicele 3.

46. Estimările K_{oc} (coeficientul de adsorție normalizată a carbonului organic) și K_{om} (coeficientul de distribuție normalizată a materiei organice) pot fi obținute și din rezultatele percolării în coloane prin utilizarea distanței de percolare medie sau corelații consacrate între RMF și K_{om} respectiv K_{oc} (4) sau prin aplicarea teoriei cromatografiei simple (24). Totuși, metoda din urmă trebuie utilizată cu precauție, mai ales dacă se ia în considerare faptul că procesul de percolare nu implică exclusiv condiții de fluxuri saturate, ci mai degrabă sisteme nesaturate.

([1]) În sol se pot forma mai mulți produși majori de transformare, ei putând apărea în diferite momente în cursul unui studiu privind transformarea. În astfel de cazuri, ar putea fi necesară realizarea unor studii privind percolarea cu reziduuri învechite cu vârste diferite.

▼M6

Interpretarea rezultatelor

47. Studiile de percolare în coloană descrise în această metodă permit determinarea potențialului de percolare sau de mobilitate în sol al substanței chimice testate (în studiul de percolare a substanței parentale) și/sau al produșilor de transformare (în studiul de percolare a reziduurilor învechite). Aceste teste nu estimează din punct de vedere cantitativ comportamentul de percolare în condiții de teren, însă ele pot fi utilizate pentru a compara „percolabilitatea" a unei substanțe chimice cu a altor substanțe chimice al căror comportament de percolare poate fi cunoscut (24). De asemenea, ele nu măsoară cantitativ procentul de substanțe chimice aplicate care ar putea ajunge în apele freatice (11). Cu toate acestea, rezultatele studiilor de percolare pe coloană pot contribui la a decide dacă sunt necesare testări suplimentar în mediul natural sau seminatural pentru substanțele chimice care prezintă un potențial mare de mobilitate în testele de laborator.

Raportul privind testul

48. Raportul trebuie să conțină:

Substanța chimică testată și substanța chimică de referință (atunci când este utilizată):

— denumirea comună, denumirea chimică (nomenclatura IUPAC și CAS), numărul CAS, structura chimică (indicând poziția marcatorului dacă se folosește substanță marcată radioactiv) și proprietățile fizico-chimice relevante;

— puritățile (impuritățile) substanței chimice testate;

— puritatea radiochimică a substanței chimice marcate și activitatea specifică (dacă este cazul).

Solurile de testare:

— detalii privind locul de colectare;

— proprietățile solurilor, precum pH-ul, conținutul de carbon organic și de argilă, textura și densitatea brută (pentru solul perturbat);

— activitatea microbiană a solului (numai pentru solul folosit pentru învechirea substanței chimice testate);

— durata depozitării solului și condițiile de depozitare.

Condiții de testare:

— datele la care au fost realizate studiile;

— lungimea și diametrul coloanelor de percolare;

— greutatea totală a solului din coloanele de sol;

— cantitatea de substanță chimică testată și, dacă este cazul, a substanței chimice de referință;

— cantitatea, frecvența și durata aplicării ploii artificiale;

— temperatura de desfășurare a experimentului;

— numărul replici (cel puțin două);

— metodele de analiză a substanței chimice testate, a produșilor de transformare și, dacă este cazul, a substanței chimice de referință din diferite segmente de sol și din percolat;

— metodele de caracterizare și identificare a produșilor de transformare în segmentele de sol și în percolat.

▼M6

Rezultatele testului:

— tabele cu rezultatele exprimate în concentrații și ca % din doza aplicată pentru segmentele de sol și percolat;

— bilanțul masic, dacă este cazul;

— volumele de percolat;

— distanțele de percolare și, dacă este cazul, factorii de mobilitate relativă;

— trasarea grafică a % găsit în segmentele de sol în raport cu adâncimea segmentului de sol;

— discutarea și interpretarea rezultatelor.

BIBLIOGRAFIE

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Annex I to Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, OJ L 172, 22.7.1995, p. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(13) The following chapters of this Annex:

Chapter A.4, vapour pressure

Chapter A.6, Water solubility

▼**M6**

Chapter A.8, Partition coefficient, shake flask method

Chapter A.24, Partition coefficient, HPLC method

Chapter C.7, degradation — abiotic degradation: hydrolysis as a function of pH

Chapter C.18, Adsorption/desorption using a batch equilibrium method

Chapter C.23, Aerobic and anaerobic transformation in soil

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

Apendicele 1

Definiții și unități

Reziduu de sol învechit: Substanța chimică testată și produșii de transformare prezenți în sol după aplicare și după o perioadă suficient de lungă pentru a permite transportul, adsorbția, metabolismul și procesele de disipare pentru a modifica distribuirea și natura chimică unei părți din substanța chimică aplicată (1).

Ploaia artificială: 0,01 M soluție de $CaCl_2$ în apă distilată sau deionizată.

Distanța medie de percolare: Partea de jos a secțiunii de sol unde substanța chimică recuperată cumulată = 50 % din totalul substanței chimice recuperate [experiment de percolare normal] sau; (partea de jos a secțiunii de sol unde substanța chimică recuperată cumulată = 50 % din totalul substanței chimice recuperate) – [(grosimea stratului de sol învechit/2] [studiu de percolare a reziduului învechit]

Substanța chimică: o substanță sau un amestec

Percolat: Faza apoasă percolată printr-un profil de sol sau o coloană de sol (1).

Percolare: Proces prin care o substanță chimică se deplasează descendent prin profilul de sol sau o coloană sol (1).

Distanța de percolare: Cel mai adânc segment de sol în care s-a constatat ≥ 0,5 % din substanța chimică testată aplicată sau reziduul învechit aplicat după procesul de percolare (echivalentă cu adâncimea de penetrare).

Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ): Limita de detecție (LOD) este concentrația unei substanțe chimice sub care identitatea unei substanțe chimice nu mai poate fi deosebită de artefactele analitice. Limita de cuantificare (LOQ) este concentrația unei substanțe chimice sub care concentrația nu poate fi determinată cu o precizie acceptabilă.

Factorul de mobilitate relativă (*Relative Mobility Factor*) RMF: [distanța de percolare a substanței chimice testate (cm)] / [distanța de percolare a substanței chimice de referință (cm)]

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

Produs de transformare: toate substanțele chimice rezultate din reacțiile de transformare biotice sau abiotice ale substanței chimice testate, incluzând CO_2 și produșii legați în reziduuri.

Sol: un amestec de constituenți chimici minerali și organici, aceștia din urmă conținând compuși cu un conținut ridicat de carbon și azot și cu mase moleculare mari, populat cu organisme mici (în cea mai mare parte microorganisme). Solul poate fi manipulat în două forme:

— neperturbat, așa cum s-a format în timp, în straturile caracteristice ale unei varietăți de tipuri de sol;

— perturbat, așa cum se găsește de obicei în terenurile arabile când eșantioanele se prelevează prin săpare și sunt utilizate în cadrul acestei metode de testare (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

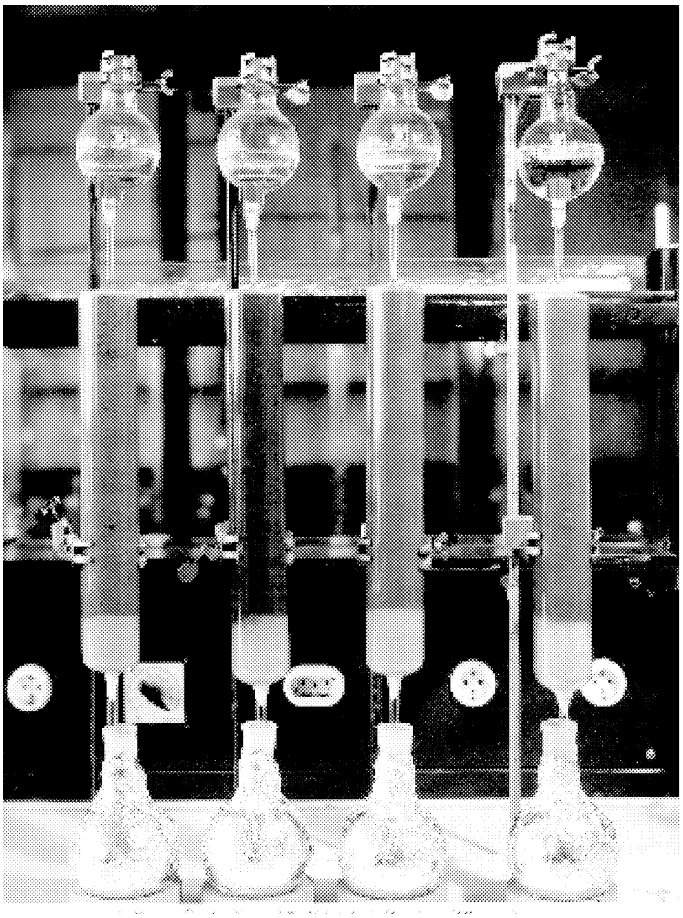
▼M6

Apendicele 2

Figura 1

Exemplu de coloane nesecționabile de percolare din sticlă

Cu o lungime de 35 cm și un diametru interior de 5 cm (1)



← Pâlnie de picurare pentru aplicarea ploii artificiale

← Disc sinterizat din sticlă pentru a evita perturbarea suprafeței solului şi pentru a distribui în mod uniform ploaia artificială

← Coloană din sticlă umplută cu sol de testare (atunci când se testează produşii fotolabili, coloanele trebuie învelite în folie de aluminiu)

← Strat de nisip de cuarț

← Dop din vată de sticlă pentru a menține solul în coloană

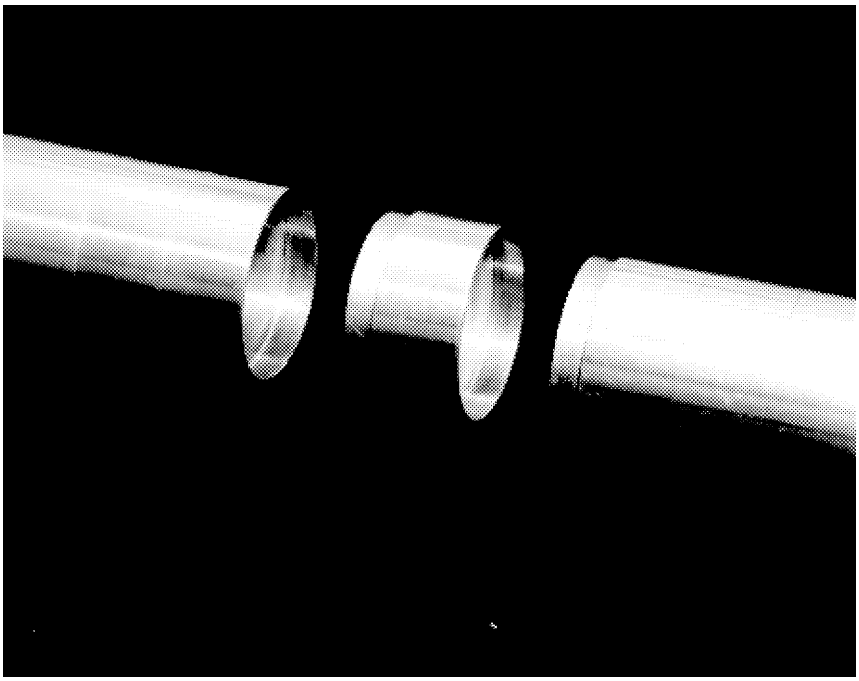
← Flacon cu fund rotund pentru colectarea percolatului; înfășurat în folie de aluminiu pentru a împiedica fotoliza

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Figura 2

Exemplu de coloană secționabilă din metal cu un diametru interior de 4 cm (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼M6

Apendicele 3

Exemple de factori de mobilitate relativă (*) (RMF) pentru o varietate de substanțe chimice fitosanitare (1) (2) și clasele de mobilitate corespunzătoare (+)

Interval RMF	Substanța chimică (RMF)	Clasa de mobilitate
≤ 0,15	Paration (< 0,15), Flurodifen (0,15)	Iimobilă
0,15 – 0,8	Profenofos (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutilazină (0,52), Metidation (0,56), Prometrin (0,59), Propazină (0,64), Alaclor (0,66), Metolaclor (0,68)	II ușor mobilă
0,8 – 1,3	Monuron (**) (1), Atrazină (1,03), Simazină (1,04), Fluometuron (1,18)	III. moderat mobilă
1,3 – 2,5	Prometon (1,67), Cianazină (1,85), Bromacil (1,91), Carbutilat (1,98)	IV relativ mobilă
2,5 – 5	Carbofuran (3), Dioxacarb (4,33)	V mobilă
> 5,0	Monocrotofos (> 5), Dicrotofos (> 5)	VI foarte mobilă

(*) Factorul de mobilitate relativă este derivat după cum urmează (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{distanța de percolare a substanței chimice testate(cm)}}{\text{distanța de percolare a substanței chimice de referință(cm)}}$$

(**) Substanța chimică de referință

\+ Alte sisteme de clasificare a mobilității substanței chimice în sol se bazează pe valorile R_f din cromatografie în strat subțire de sol \big(4) și pe valorile K_{oc} (5) (6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.” Canterbury, UK, 1-3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. ESTIMAREA EMISIILOR ÎN MEDIU PROVENITE DE LA LEMNUL TRATAT CU PRODUSE DE CONSERVARE: METODĂ DE LABORATOR PENTRU PRODUSELE DIN LEMN CARE NU SUNT ACOPERITE ȘI CARE SUNT ÎN CONTACT CU APĂ DULCE SAU CU APĂ DE MARE

INTRODUCERE

1. Prezenta metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (*test guideline* – TG) nr. 313 (2007). Emisiile provenite de la lemnul tratat cu produse de conservare în mediu trebuie cuantificate pentru a permite o evaluare a riscurilor pe care lemnul tratat îl prezintă pentru mediu. Această metodă de testare descrie o metodă de laborator pentru estimarea emisiilor provenite lemnul tratat cu produse de conservare în două situații în care emisiile ar putea pătrunde în mediu

   — Emisiile provenite de la lemnul tratat în contact cu apa dulce. Emisiile de la suprafața lemnului tratat ar putea pătrunde în apă.

   — Emisiile provenite de la lemnul tratat în contact cu apa de mare. Emisiile de la suprafața lemnului tratat ar putea pătrunde în apa de mare.

2. Această metodă de testare vizează testarea emisiilor provenite de la lemn și produsele din lemn care nu sunt acoperite și care se află în contact cu apa dulce sau cu apa de mare. Clasele de utilizare sunt folosite pe plan internațional și clasifică pericolul biologic la care va fi supus produsul tratat. Clasele de utilizare definesc, de asemenea, situația în care se utilizează produsul tratat și determină compartimentele de mediu (aer, apă, sol) care sunt supuse unui risc potențial de către lemnul tratat cu produse de conservare.

3. Metoda de testare este o procedură de laborator destinată obținerii de eșantioane de (emisii) din apa folosită pentru a scufunda lemnul tratat, la intervale de timp tot mai mari după expunere. Cantitatea de emisii din receptorul emisiilor este legată de aria suprafeței lemnului și de durata expunerii, pentru a estima un flux în $mg/m^2/zi$. Astfel se poate estima fluxul (rata de percolare) după perioade de expunere crescătoare.

4. Cantitatea de emisii poate fi utilizată într-o evaluare a riscurilor ecologice prezentate de lemnul tratat.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

5. Mecanismul de percolare de la suprafața lemnului de către apa dulce nu se presupune a fi identic din punctul de vedere al naturii și severității cu percolarea de la suprafața lemnului de către apa de mare. Astfel, pentru produsele sau amestecurile de conservare a lemnului utilizate pentru tratarea lemnului, utilizate în mediu cu apă de mare, este necesar un studiu de percolare a lemnului pentru apa de mare.

6. Lemnul, în cazul lemnului tratat cu un produs de conservare, trebuie să fie reprezentativ pentru lemnul utilizat în scopuri comerciale. El trebuie să fie tratat în conformitate cu instrucțiunile producătorului produselor de conservare și în conformitate cu standardele și specificațiile corespunzătoare. Parametrii pentru condiționarea lemnului după tratare trebuie indicați înainte de începerea testului.

7. Eșantioanele de lemn utilizate trebuie să fie reprezentative pentru produsele utilizate (de exemplu, în ceea ce privește specia, densitatea si alte caracteristici).

▼M6

8. Testul poate fi aplicat lemnului cu ajutorul unui proces penetrant sau al unei aplicări superficiale sau lemnului tratat suspus unui tratament de suprafață suplimentar obligatoriu (de exemplu, vopseaua aplicată ca cerință pentru uzul comercial).

9. Compoziția, volumul, pH-ul și forma fizică a apei sunt importante în determinarea cantității, a conținutului și a naturii emisiilor provenite de la lemn.

PRINCIPIUL METODEI DE TESTARE

10. Eșantioanele de lemn de testare tratat cu produse de conservare sunt scufundate în apă. Apa (receptorul emisiilor) este colectată și analizată chimic de mai multe ori pe parcursul perioadei de expunere, suficientă pentru a efectua calcule statistice. Ratele de emisie în $mg/m^2/zi$ sunt calculate pe baza rezultatelor analitice. Perioadele de eșantionare trebuie înregistrate. Testele cu eșantioane netratate pot fi oprite dacă nu există nicio valoare de fond detectată în primele trei puncte de date.

11. Includerea de eșantioane de lemn netratat permite determinarea nivelurilor de fond pentru receptorul emisiilor provenite de la lemn de tip diferit decât cel pentru care au fost folosite produse de conservare.

CRITERII DE CALITATE

Acuratețea

12. Precizia metodei de testare pentru a estima emisiile depinde de cât de reprezentative sunt eșantioanele de testare pentru lemnul tratat comercial, de cât de reprezentativă este apa în raport cu apa reală și de cât de reprezentativ este regimul de expunere pentru condiții naturale.

13. Acuratețea, precizia și repetabilitatea metodei analitice trebuie stabilite înainte de efectuarea testului.

Reproductibilitatea

14. Trei eșantioane de apă sunt colectate și analizate, iar valoarea medie este considerată ca fiind valoarea emisiilor. Reproductibilitatea rezultatelor în cadrul unui laborator și între diferite laboratoare depinde de regimul de imersiune și de lemnul utilizat ca eșantion de testare.

Interval acceptabil al rezultatelor

15. Este acceptabil un interval de rezultate obținute în urma acestui test, în cazul căruia valorile superioară și inferioară variază cu mai puțin de un ordin de magnitudine.

CONDIȚII DE TESTARE

Apă

16. Scenarii de percolare în apă dulce: Pentru evaluarea lemnului expus la apa dulce, pentru testul de percolare se recomandă utilizarea de apă deionizată (de exemplu, ASTM D 1193 de tip II). Temperatura apei trebuie să fie de 20 °C +/– 2 °C, iar pH-ul și temperatura apei măsurate trebuie să fie incluse în raportul privind testul. Analiza eșantioanelor de apă utilizate, prelevate înainte de imersia eșantioanelor tratate, permite estimarea substanțelor chimice analizate în apă. Acesta are rol de control menit să determine nivelurile de fond ale substanțelor chimice care sunt apoi analizate chimic.

▼M6

17. Scenarii de percolare în apă de mare: Pentru evaluarea lemnului expus la apa de mare, pentru testul de percolare se recomandă utilizarea apei de mare sintetice (de exemplu, ASTM D 1141 susbtituent de apă de ocean, fără metale grele). Temperatura apei trebuie să fie de 20 °C +/– 2 °C, iar pH-ul și temperatura apei măsurate trebuie să fie incluse în raportul privind testul. Analiza eșantioanelor de apă utilizate, prelevate înainte de imersia eșantioanelor tratate, permite estimarea substanțelor chimice analizate în apă. Acesta are rol de control pentru analiza nivelurilor de fond pentru substanțele chimice importante.

Eșantioane de lemn pentru testare

18. Speciile de lemn trebuie să fie dintre cele utilizate pentru testarea eficacității produselor de conservare a lemnului. Speciile recomandate sunt *Pinus sylvestris L.* (pinul scoțian), *Pinus resinosa Ait.* (pinul roșu) sau *Pinus spp* (pinul sudic). Pot fi efectuate teste suplimentare folosind alte specii.

19. Trebuie să se utilizeze lemn neted, fără noduri. Trebuie evitate exemplarele cu aspect rășinos. Lemnul trebuie sa fie reprezentativ pentru lemnul disponibil în comerț. Sursă, densitatea și numărul de inele anuale per 10 mm trebuie înregistrate.

20. Se recomandă ca eșantioanele de lemn de testare să fie constituite din seturi de cinci conforme standardului EN 113 privind dimensiunea blocurilor (dimensiuni de 25 mm × 50 mm × 15 mm), cu fețele longitudinale paralele cu fibra lemnului, deși pot fi utilizate și alte dimensiuni precum 50 mm × 150 mm × 10 mm. Eșantionul de testare trebuie să fie complet scufundat în apă. Eșantioanele de testare se compun 100 % din lemn curățat. Fiecare eșantion este marcat unic astfel încât să poată fi identificat pe toată durata testului.

21. Toate eșantioanele de testare trebuie să fie rindeluite sau tăiate neted, dar suprafețele nu trebuie să fie șmirgheluite.

22. Numărul de seturi de eșantioane de lemn utilizate pentru analizare este de cel puțin cinci: trei seturi de eșantioane sunt tratate cu produs de conservare, un set de eșantioane este netratat, iar un set de eșantioane este utilizat pentru estimarea conținutului de umiditate prin metoda uscării în cuptor a eșantioanelor testate înainte de tratament. Se prepară suficiente eșantioane de testare pentru a permite alegerea a trei seturi de eșantioane care se situează în limita a 5 % din valoarea medie a reținerilor de produs de conservare pentru grupul de eșantioane de testare.

23. Toate eșantioanele sunt izolate la capete cu o substanță chimică care împiedică pătrunderea produsului de conservare în capătul lor sau împiedică percolarea din eșantioane prin intermediul capătului. Este necesar să se facă o distincție între eșantioanele folosite pentru aplicare superficială și procesele de penetrare pentru aplicarea izolantului la capete. Aplicarea izolantului la capete trebuie realizată înainte de tratament numai în cazul aplicării superficiale.

24. Capătul trebuie să fie deschis pentru tratamente prin procese de penetrare. Prin urmare, eșantioanele trebuie să fie izolate la capete la sfârșitul perioadei de condiționare. Emisia trebuie să fie estimată numai pentru suprafața longitudinală. Materialele de izolare trebuie inspectate și reaplicate dacă este necesar înainte de a începe percolarea și nu trebuie reaplicate după ce percolarea a fost inițiată.

▼M6

Recipientul de imersie

25. Recipientul este confecționat dintr-un material inert și este destul de mare pentru a conține 5 eșantioane de lemn EN113 în 500 ml de apă rezultând un raport arie per volum de apă de 0,4 cm^2/ml.

Ansamblul de testare a eșantioanelor

26. Eșantioanele de testare sunt susținute pe un ansamblu care permite ca toate suprafețele expuse ale eșantioanelor să fie în contact cu apa.

PROCEDURA DE TRATARE CU PRODUS DE CONSERVARE

Pregătirea eșantioanelor de testare tratate

27. Eșantionul de lemn de testare care urmează să fie tratat cu produsul de conservare supus testării este tratat prin metoda specificată pentru respectivul produs de conservare, care poate fi de un proces de tratare prin penetrare sau un proces de aplicare superficială, de exemplu prin imersie, pulverizare sau pensulare.

Produsele de conservare aplicate prin procese de tratament prin penetrare

28. Trebuie preparată o soluție a produsului de conservare care să permită absorbția sau retenția specificată atunci când este aplicată prin intermediul procesului de tratare prin penetrare. Eșantionul de lemn de testare este cântărit, iar dimensiunile sale sunt măsurate. Procesul de tratare prin penetrare trebuie să fie cel specificat pentru aplicarea produsului de conservare a lemnului utilizat în clasa 4 sau 5 de utilizare. Eșantionul este din nou cântărit după tratament și retenția produsului de conservare (kg/m^3) este calculată pe baza ecuației:

$$\frac{\text{masa după tratament(kg)} - \text{masa înainte de tratament(kg)}}{\text{Volumul eșantionului de testare}(m^3)} \times \frac{\text{concentrația soluției(\% masă/masă)}}{100}$$

29. Trebuie remarcat faptul că în acest test poate fi utilizat lemn tratat într-o fabrică de tratare industrială \big(de exemplu, prin impregnare la presiune mică). Procedurile utilizate trebuie înregistrate și retenția materialului tratat astfel trebuie analizată și înregistrată.

Produsele de conservare care urmează să fie aplicate prin procese de aplicare superficială

30. Procesul de aplicare superficială include imersia, pulverizarea sau pensularea eșantioanelor de lemn de testare. Procesul și rata de aplicare (de exemplu, litri/m^2) trebuie să fie astfel cum se specifică pentru aplicarea superficială a produsului de conservare.

31. De asemenea, trebuie remarcat faptul că, în acest caz, lemnul tratat într-o fabrică de tratare industrială pot fi utilizat în acest test. Procedurile utilizate trebuie înregistrate și retenția materialului tratat astfel trebuie analizată și înregistrată.

Condiționarea eșantioanelor de testare după tratare

32. După tratare, specimenele de testare tratate trebuie să fie condiționate în conformitate cu recomandările furnizorului de produse de conservare potrivit cerințelor privind etichetele produselor de conservare sau în conformitate cu practicile de tratare comerciale sau în conformitate cu standardul EN 252.

▼M6

Pregătirea și selectarea eșantioanelor de testare

33. După condiționarea în urma tratării, retenția medie a grupului de eșantioane de testare este calculată, iar trei seturi de eșantioane cu o retenție care se situează în intervalul +/- 5 % din media grupului sunt selectate în mod aleatoriu pentru măsurători ale percolării.

PROCEDURA PENTRU MĂSURAREA EMISIILOR DE PRODUSE DE CONSERVARE

Metoda prin imersie

34. Eșantioanele de testare sunt cântărite și apoi scufundate total în apă, înregistrându-se data și ora aferente. Recipientul este acoperit pentru a reduce evaporarea.

35. Apa este înlocuită la următoarele intervale: 6 ore, 1 zi, 2 zile, 4 zile, 8 zile, 15 zile, 22 de zile, 29 de zile (notă: acestea sunt durate totale, nu intervalele de timp). Ora și data schimbării apei și masa de apă recuperată din recipient trebuie înregistrate.

36. După fiecare schimbare a apei, este reținut pentru analize chimice ulterioare un eșantion de apă în care a fost scufundat setul de eșantioane de testare.

37. Procedura de eșantionare permite calcularea profilului cantității de emisii în funcție de timp. Eșantioanele trebuie depozitate în condiții care să asigure conservarea substanței analizate, de exemplu într-un frigider la întuneric pentru a reduce proliferarea microbilor în eșantion înainte de analiză.

MĂSURAREA EMISIILOR

Eșantioane tratate

38. Apa colectată este analizată chimic pentru a se verifica substanța activă și/sau produsele de degradare/transformare relevante, dacă este cazul.

Eșantioane netratate

39. Colectarea apei (receptorul emisiilor) în acest sistem și analiza ulterioară a substanțelor chimice care au percolat din eșantioanele de lemn netratat permit estimarea posibilei rate de emisii a produsului de conservare din lemnul netratat. Colectarea și analizarea de receptor de emisii după perioade de expunere crescătoare permit estimarea ratei schimbării ratei de emisii în funcție de timp. Această analiză este o procedură de control care vizează determinarea nivelurilor de fond ale substanței chimice testate în lemnul netratat pentru a confirma faptul că lemnul utilizat ca sursă de eșantioane nu a fost tratat anterior cu produse de conservare.

DATE ȘI RAPORTARE

Analizele chimice

40. Apa colectată este analizată chimic, iar rezultatul analizei apei este exprimat în unități corespunzătoare, de exemplu µg/l.

Înregistrarea datelor

41. Toate rezultatele sunt înregistrate. Apendicele prezintă un exemplu al formei de înregistrare recomandate pentru un set de eșantioane de testare tratate și tabelul de sinteză pentru calcularea valorilor medii ale emisiilor pentru fiecare interval de eșantionare.

42. Fluxul zilnic al emisiilor exprimat în $mg/m^2/zi$ se calculează împărțirea mediei celor trei măsurători ale celor trei replici la numărul de zile de imersie.

▼M6

Raportul privind testul

43. Cel puțin următoarele informații trebuie furnizate în raportul privind testul.

— Numele furnizorului produsului de conservare supus testării;

— Denumirea sau codul unic sau specific al produsului de conservare supus testării;

— Denumirea comercială sau comună a ingredientului sau a ingredienților activi cu o descriere generică a excipienților (de exemplu, cosolvenți, rășină) și compoziția în % de m/m a ingredienților;

— Retenția sau încărcarea relevantă (în kg/m^3 sau, respectiv, l/m^2) specificată pentru lemnul utilizat în contactul cu apa;

— Speciile de lemn utilizate cu densitatea lor și rata de creștere în inele per 10 mm;

— Încărcarea sau retenția produsului de conservare testat și formula utilizată pentru calcularea retenției exprimată ca l/m^2 sau ca kg/m^3;

— Metoda de aplicare a produsului de conservare, specificând calendarul de tratament utilizat pentru procesul prin penetrare și metoda de aplicare în cazul folosirii unui tratament superficial;

— Data aplicării produsului de conservare și o estimare a conținutului de umiditate a eșantioanelor de testare, exprimate în procente;

— Procedurile de condiționare utilizate, specificând tipul, condițiile și durata;

— Specificațiile materialului de izolare a capetelor și numărul de aplicări;

— Specificarea oricărui tratament ulterior al lemnului, de exemplu specificarea furnizorului, tipul, caracteristicile și încărcarea unei vopsele;

— Ora și data fiecărui eveniment de imersie, cantitatea de apă utilizată pentru imersia eșantioanelor de testare în cadrul fiecărui eveniment și cantitatea de apă absorbită de lemn pe durata imersiei;

— Orice abatere de la metoda descrisă și orice factori care ar fi putut influența rezultatele.

BIBLIOGRAFIE

(1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part1: General.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Apendicele 1

Formular de înregistrare pentru metoda de testare

Estimarea emisiilor din lemnul tratat cu conservant în mediu: Metodă de laborator pentru produsele din lemn care nu sunt acoperite și care sunt în contact cu apă dulce sau cu apă de mare

Locul testării	

Conservant pentru lemn

Furnizorul conservantului	
Denumirea sau codul specific și unic al conservantului	
Denumirea comercială sau comună a conservantului	
Excipienți	
Retenția relevantă pentru lemnul folosit în contact cu apă	

Aplicarea

Metoda de aplicare	
Data aplicării	
Formula utilizată pentru calcularea retenției:	
Procedura de condiționare	
Durata condiționării	
Materialul de izolare a capetelor/numărul de aplicări	
Tratamentul ulterior	dacă este cazul

Specimene de testare

Specii de lemn	
Densitatea lemnului	(minimum … valoare medie … maximum)
Rata de creștere (inele per 10 mm)	(minimum … valoare medie … maximum)
Conținutul de apă	

▼M6

Ansamblul de testare (*)	**Retenție (kg/m^3)**
Tratat „x”	Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene
Tratat „y”	Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene
Tratat „z”	Valoarea medie și deviația standard sau intervalul pentru 5 specimene
Netratat	
Variația parametrilor metodei de testare	de exemplu, calitatea apei, dimensiunea specimenelor de testare etc.

(*) x, y, z reprezintă trei eșantioane replică

▼M6

Timp	Schimbarea apei	Masa specimenului		Consumul de apă		Eșantionul de apă				
		Tratat (medie)	Netratat	Tratat (medie)	Netratat		Apa de testare	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nr.	pH	pH	pH	pH
start										
6 h						1				
24 h						2				
2 zile						3				
4 zile						4				
8 zile						5				
15 zile						6				
22 zile						7				
29 zile						8				

▼M6

A se realiza tabele separate pentru fiecare ingredient activ

Timp	Schimbarea apei	Rezultate analitice															
		Specimene netratate			Specimene tratate												
					Concentrația i.a. în apă				Cantitate emisă				Rata emisiilor				
		Concentrația i.a. în apă mg/l	Cantitate emisă mg/m2	Rata emisiilor mg/m2/zi	x	y	z	Medie	x	y	z	Medie	x	y	z	Medie	
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m2	mg/m2	mg/m2	mg/m2	mg/m2/zi	mg/m2/zi	mg/m2/zi	mg/m2/zi	
6 h																	
24 h																	
2 zile																	
4 zile																	
8 zile																	
15 zile																	
22 zile																	
29 zile																	

Notă: Deoarece rezultatele lemnului netratat pot fi utilizate pentru a corecta ratele emisiilor eșantioanelor tratate, ele trebuie să apară primele și toate valorile pentru eșantioanele tratate ar fi „valori corecte”. Poate exista, de asemenea, o corecție pentru analiza inițială a apei.

▼**M6**

Apendicele 2

Definiții

Substanța chimică: o substanță sau un amestec.

Substanța chimică testată: orice substanță sau amestec testat cu ajutorul acestei metode de testare.

▼M6

C.46. BIOACUMULAREA ÎN OLIGOCHETELE BENTICE CARE TRĂIESC ÎN SEDIMENTE

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 315 (2008). Animalele endobentice care ingeră sedimente pot fi expuse la substanțe legate de sedimente (1). Printre aceste organisme care ingeră sedimente, oligochetele acvatice joacă un rol important la baza sistemelor acvatice. Acestea trăiesc în sedimente și deseori reprezintă cele mai abundente specii, mai ales în habitate cu condiții de mediu adverse pentru alte animale. Prin forarea sedimentului și prin funcția lor de pradă, aceste animale pot avea o puternică influență asupra biodisponibilității respectivelor substanțe pentru alte organisme, de exemplu peștii care se hrănesc cu organisme bentice. Spre deosebire de organismele epibentice, oligochetele acvatice endobentice sapă galerii în sediment și ingeră particule de sediment de sub suprafața sedimentului. Din acest motiv, aceste organisme sunt expuse la substanțe prin multe căi de absorție incluzând contactul direct, ingestia de particule de sediment contaminate, apa interstițială sau apa acoperitoare. Unele specii de oligochete bentice care sunt folosite în prezent în cadrul testelor ecotoxicologice sunt descrise în apendicele 6.

2. Parametrii care caracterizează bioacumularea unei substanțe includ, în primul rând, factorul de bioacumulare (*bioaccumulation factor* – BAF), constanta vitezei de absorție din sediment (k_s) și constanta vitezei de eliminare (k_e). Definițiile detaliate ale acestor parametri sunt prezentate în apendicele 1.

3. Pentru a evalua potențialul de bioacumulare al substanțelor în general și pentru a investiga bioacumularea substanțelor care tind să pătrundă în sau pe sedimente este necesară o metodă specifică pentru fiecare compartiment (1) (2) (3) (4).

4. Această metodă de testare este concepută pentru a evalua bioacumularea substanțelor asociate sedimentelor la viermii de oligochete endobentice. Substanța testată este adiționată în sediment. Utilizarea sedimentului adiționat are menirea să simuleze un sediment contaminat.

5. Această metodă se bazează pe metodele existente de testare a toxicității și a bioacumulării în sedimente (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Alte documente utile sunt: discuțiile și rezultatele unui atelier de lucru internațional (11) și rezultatul unui test interlaboratoare internațional (12).

6. Acest test se aplică substanțelor organice stabile și neutre care tind să se asocieze cu sedimentele. Bioacumularea compușilor metalo-organici stabili asociați cu sedimentele poate fi, de asemenea, măsurată cu ajutorul acestei metode (12). Acesta nu este aplicabilă în cazul metalelor sau al altor microelemente (11) fără modificarea protocolului de testare în ceea ce privește volumul substratului și al apei și eventual a dimensiunii eșantionului de țesut.

CONDIȚII PREALABILE ȘI INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA TESTATĂ

7. Există disponibile în prezent doar câteva relații structură-activitate cantitative (*Quantitative Structure-Activity Relationships* – QSAR) bine stabilite privind procesele de bioacumulare (14). Cea mai mult folosită relație este corelația între bioacumulare și bioconcentrarea substanțelor organice stabile și lipofilia lor [exprimată ca logaritmul coeficientului de partiție octanol-apă (log K_{ow}); a se vedea apendicele 1 pentru definiție], respectiv, care a fost elaborată pentru descrierea migrării unei substanțe între apă și de pești. Corelații pentru compartimentul de sedimente au fost, de asemenea, stabilite cu

▼M6

ajutorul acestei relații (15), (16), (17), (18). Corelația log K_{ow}-log BCF ca QSAR majoră poate fi utilă pentru o primă estimare preliminară a potențialului de bioacumulare a substanțelor asociate sedimentului. Cu toate acestea, BAF poate fi influențat de conținutul de lipide al organismului testat și de conținutul de carbon organic din sediment. Prin urmare, coeficientul de partiție carbon organic-apă (K_{oc}) poate fi, de asemenea, utilizat ca un determinant major al bioacumulării substanțelor organice asociate sedimentului.

8. Acest test se aplică pentru:

— substanțele organice stabile cu valori ale log K_{ow} cuprinse între 3 și 6 (5)(19) și substanțele superlipofile care au un log K_{ow} mai mare de 6 (5);

— substanțele care aparțin unei clase de substanțe organice cunoscute pentru potențialul lor de bioacumulare în organismele vii, de exemplu agenții tensioactivi sau substanțele ușor absorbabile (de exemplu, cu K_{oc} mare).

9. Înainte de începerea studiului trebuie obținute informații cu privire la substanța testată, precum precauțiile de siguranță, condițiile adecvate de depozitare și stabilitatea, precum și metodele analitice. Orientări privind substanțele testate cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate în (20) și (21). Înainte de efectuarea unui test privind bioacumularea cu oligochete acvatice, sunt necesare următoarele informații privind substanța testată:

— denumirea comună, denumirea chimică (de preferință denumirea IUPAC), formula structurală, numărul de înregistrare CAS, puritatea;

— solubilitatea în apă [metoda de testare A.6 (22)];

— coeficientul de partiție octanol-apă, K_{ow} [metodele de testare A.8, A.24 (22)];

— coeficientul de partiție sediment-apă, exprimat ca K_d sau K_{oc} [metoda de testare C.19 (22)];

— hidroliza [metoda de testare C.7 (22)];

— fototransformarea în apă (23);

— presiunea vaporilor [metoda de testare A.4 (22)];

— biodegradabilitatea rapidă [metodele de testare C.4 și C.29 (22)];

— tensiunea suprafeței [metoda de testare A.5 (22)];

— concentrația critică a micelelor (24).

În plus, următoarele informații – dacă sunt disponibile – ar fi relevante:

— biodegradarea în mediul acvatic [metodele de testare C.24 și C.25 (22)];

— constanta legii lui Henry.

10. Substanțele testate marcate radioactiv pot facilita analiza eșantioanelor de apă, sediment și biologice și pot fi utilizate pentru a determina dacă sunt necesare identificarea și cuantificarea produșilor de degradare. Metoda descrisă aici fost validată printr-un testul interlaboratoare internațional (12) pentru substanțe marcate cu ^{14}C. Dacă reziduurile radioactive totale sunt măsurate, factorul de bioacumulare (BAF) se bazează pe substanța parentală inclusiv orice produs de degradare reținut. De asemenea, este

▼M6

posibilă combinarea unui studiu de metabolism cu un studiu de bioacumulare prin analiza și cuantificarea procentului de substanță parentală și a produșilor ei de degradare în eșantioanele prelevate la sfârșitul fazei de absorbție sau la vârful bioacumulării. În orice caz, se recomandă calcularea BAF pe baza concentrației substanței parentale din organism și nu numai pe baza totalului de reziduuri radioactive.

11. În plus față de proprietățile substanței testate, alte informații necesare sunt toxicitatea pentru speciile de oligochete care urmează să fie utilizate în test, precum concentrația letală mediană (LC_{50}) pentru timpul necesar fazei de absorbție, pentru a asigura că respectivele concentrații de expunere selectate sunt mult mai mici decât nivelurile toxice. Dacă sunt disponibile, trebuie utilizate în mod preferențial valorile de toxicitate determinate din studiile de lungă durată folosind parametri de studiu subletali (EC_{50}). Dacă astfel de date nu sunt disponibile, un test al toxicității acute în condiții identice cu cele ale testului de bioacumulare sau date privind toxicitatea pentru alte specii surogat pot furniza informații utile.

12. Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică adecvată pentru care se cunosc acuratețea, precizia și sensibilitatea în vederea cuantificării substanței din soluțiile de testare, din sediment și din materialul biologic, împreună cu detalii privind prepararea și depozitarea eșantioanelor, precum și cu fișe tehnice de siguranță. Limitele de detectare analitică ale substanței testate în apă, în sediment și în țesutul viermilor trebuie, de asemenea, să fie cunoscute. În cazul utilizării unei substanțe testate marcate radioactiv, radioactivitatea specifică (Bq mol^{-1}), poziția atomului marcat radioactiv și procentul radioactivității asociate cu impurități trebuie, de asemenea, să fie cunoscute. Radioactivitatea specifică a substanței testate trebuie să fie cât mai mare posibil pentru a detecta concentrațiile de testare cât mai mici posibil (11).

13. Trebuie să fie puse la dispoziție informații privind caracteristicile sedimentului care urmează să fie utilizat [originea sedimentului sau a constituenților săi, pH-ul și concentrația de amoniac a apei interstițiale (sedimente naturale), conținutul de carbon organic (TOC), distribuția dimensiunii particulelor (procent de nisip, de mâl și de argilă) și procentul greutății uscate] (6).

PRINCIPIUL TESTULUI

14. Testul constă în două faze; faza de absorbție (expunere) și faza de eliminare (postexpunere). Pe durata fazei de absorbție, viermii sunt expuși la sediment adiționat cu substanța testată, acoperiți cu apă reconstituită și echilibrați în mod corespunzător (11). Grupele de viermi de control sunt ținute în condiții identice fără substanța testată.

15. Pentru faza de eliminare, viermii sunt transferați într-un sistem sediment-apă fără substanța testată. O fază de eliminare este necesară pentru a obține informații privind viteza cu care substanța testată este excretată de organismele de testare (19) (25). O fază de eliminare este necesară întotdeauna, exceptând cazul în care absorbția substanței testate în timpul fazei de expunere a fost nesemnificativă (de exemplu, nu există diferențe statistice între concentrația substanței testate în viermi testați și în cei de control). În cazul în care o stare de echilibru nu a fost atinsă în timpul fazei de absorbție, determinarea cineticii – BAF_K, a constantei sau a constantelor vitezei de absorbție și de eliminare – pot fi efectuate utilizând rezultatele fazei de eliminare. Modificarea concentrației substanței testate din/de pe viermi se monitorizează pe parcursul ambelor faze ale testului.

16. Pe durata fazei de absorbție, se efectuează măsurători până când BAF ajunge la un platou sau la o stare de echilibru. Implicit, durata fazei de absorbție trebuie să fie de 28 de zile. Experiența practică a demonstrat că o fază de absorbție de 12 – 14 zile este suficientă pentru ca mai multe substanțe organice stabile și neutre să atingă o stare de echilibru (6) (8) (9).

▼**M6**

17. Cu toate acestea, dacă starea de echilibru nu este atinsă în termen de 28 de zile, faza de eliminare este începută prin transferarea oligochetelor în vase conținând același mediu fără substanța testată. Faza de eliminare este încheiată fie atunci când este atins nivelul de 10 % al concentrației măsurate în viermi în ziua 28 a fazei de absorbție, fie după o perioadă maximă de 10 zile. Nivelul rezidual din viermi la sfârșitul fazei de eliminare este raportat ca parametru de studiat suplimentar, adică ca reziduuri neeliminate (*non-eliminated residues* – NER). Factorul de bioacumulare (BAF_{ss}) se calculează de preferință ca raportul dintre concentrația din viermi (C_a) și din sediment (C_s) la starea de echilibru aparentă și ca factor de bioacumulare cinetic, BAF_K ca raportul între constanta vitezei de absorbție din sediment (k_s) și constanta vitezei de eliminare (k_e) pe baza unei cinetici de ordinul întâi. Dacă în termen de 28 de zile nu este obținută o stare de echilibru, BAF_K se calculează pe baza constantei (constantelor) vitezei de absorbție și de eliminare. Pentru modul de calculare, a se vedea apendicele 2. În cazul în care cinetica de ordinul întâi nu este aplicabilă, trebuie utilizate modele mai complexe [apendicele 2 și referința (25)].

18. În cazul în care în termen de 28 de zile nu este obținută o stare de echilibru, faza de absorbție poate, în mod opțional, să fie prelungită pentru grupurile de viermi expuși – dacă sunt disponibili – pentru măsurători suplimentare până la atingerea unei stări de echilibru; în paralel, faza de eliminare trebuie totuși să fie începută în ziua 28 a fazei de absorbție.

19. Constanta vitezei de absorbție, constanta vitezei de eliminare (sau constantele, în cazul în care sunt implicate modele mai complexe), factorul de bioacumulare cinetică (BAF_K) și, dacă este posibil, limitele de încredere pentru fiecare dintre acești parametri, se calculează plecând de la ecuații model computerizate (a se vedea apendicele 2 pentru modele). Cât de adecvată este utilizarea unui model poate fi determinată din coeficientul de corelație sau coeficientul de determinare (coeficienții apropiați de 1 indică o bună adecvare).

20. Pentru a reduce variabilitatea în rezultatele testelor pentru substanțele organice cu lipofilie mare, factorii de bioacumulare trebuie să fie exprimați în plus în legătură cu conținutul de lipide al organismelor de testare și cu conținutul de carbon organic (TOC) din sediment (factorul de acumulare biotă-sediment sau BSAF în kg sediment TOC kg^{-1} de conținut de lipide în viermi). Această metodă se bazează pe experiențe și pe corelațiile teoretice pentru compartimentul acvatic, în cazul în care – pentru unele clase de substanțe chimice – există o relație clară între potențialul unei substanțe de a se bioacumula și lipofilia acesteia, care a fost bine stabilită pentru pești ca model de organisme (14) (25) (27). De asemenea, există o relație între conținutul de lipide al peștilor de testare și bioacumularea observată a acestor substanțe. Pentru organismele bentice au fost identificate corelații similare (15) (16) (17) (18). Dacă este disponibil suficient țesut de vierme, conținutul de lipide al animalelor de testare poate fi determinat pe același material biologic ca cel utilizat pentru determinarea concentrației de substanță chimică testată. Totuși, este practic să se utilizeze animalele de control aclimatizate cel puțin la începutul sau – de preferință – la finalul fazei de absorbție în vederea măsurării conținutului de lipide, care pot fi apoi utilizate pentru a normaliza valorile BAF.

VALIDITATEA TESTULUI

21. Pentru ca un test să fie valid, trebuie să se aplice următoarele condiții:

— Mortalitatea cumulată a viermilor (control și tratament) până la sfârșitul testului nu trebuie să depășească 20 % din numărul inițial.

— În plus, trebuie să se demonstreze că viermii sapă galerii în sediment pentru a permite o expunere maximă. Pentru detalii, a se vedea punctul 28.

▼M6

DESCRIEREA METODEI

Speciile folosite pentru testare

22. Mai multe specii de oligochete acvatice pot fi folosite pentru testare. Speciile cel mai frecvent folosite sunt enumerate în apendicele 6.

23. Testele de toxicitate (96 h, în numai apă) trebuie efectuate la intervale regulate (de exemplu, în fiecare lună), cu o substanță toxică de referință precum clorura de potasiu (KCl) sau sulfatul de cupru ($CuSO_4$) (1) pentru a demonstra starea de sănătate a animalelor de testare (1) (6). În cazul în care testele de toxicitate de referință nu sunt efectuate la intervale regulate, lotul organismelor care urmează să fie utilizate într-un test de bioacumulare în sediment trebuie verificat cu ajutorul unei substanțe toxice de referință. Măsurarea conținutului de lipide poate furniza, de asemenea, informații utile privind starea animalelor.

Cultura organismelor de testare

24. Pentru a avea un număr suficient de viermi pentru efectuarea testelor de bioacumulare, este utilă menținerea viermilor în cultură de laborator permanentă monospecie. Metodele de cultură în laborator pentru speciile de testare selectate sunt sintetizate în apendicele 6. Pentru detalii, a se vedea referințele (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Aparatură

25. A se evita, pentru toate componentele echipamentelor, utilizarea de materiale care pot dizolva și absorbi substanțele testate sau care pot percola alte substanțe și care pot avea un efect advers asupra animalelor de testare. Pot fi folosite camere standard rectangulare sau cilindrice, realizate din material inert chimic și cu o capacitate adecvată, în concordanță cu rata de încărcare, adică cu numărul de viermi testați. Trebuie evitată utilizarea de tuburi din plastic moale pentru administrarea apei sau a aerului. Politetrafluoretilena, oțelul inoxidabil și/sau sticla trebuie utilizate pentru orice echipament care intră în contact cu mediul de testare. Pentru substanțele cu coeficienți mari de adsorbție, cum ar fi piretroidele de sinteză, poate fi necesară sticla silanizată. În aceste cazuri, echipamentul se va elimina după utilizare (5). A se evita, pentru substanțele de testare marcate radioactiv și pentru substanțele volatile, detașarea sau scăparea substanțelor testate detașate. Trebuie utilizate captatoare (de exemplu, flacoane din sticlă de spălare a gazelor) care conțin absorbanți adecvați pentru a reține orice reziduuri care se evaporă din camerele de testare (11).

Apă

26. Calitatea apei acoperitoare trebuie să permită supraviețuirea speciei de testare, în perioada de aclimatizare și pe parcursul testării, fără apariția unui comportament sau aspect anormal. Apă reconstituită în conformitate cu metoda de testare C.1 (25) este recomandată pentru utilizarea ca apă acoperitoare în teste, precum și în culturile de laborator ale viermilor. S-a demonstrat că mai multe specii de testare pot supraviețui, crește și se pot reproduce în acest tip de apă (8) fiind asigurată o standardizare maximă a condițiilor de testare și de cultură. Apa trebuie să fie caracterizată cel puțin prin pH, conductivitate și duritate. Analiza micropoluanților din apă înainte de utilizarea acesteia ar putea să furnizeze informații utile (apendicele 4).

27. Pe toată perioada testării, apa trebuie să fie de calitate constantă. pH-ul apei acoperitoare trebuie să fie cuprins între 6 și 9. Duritatea totală trebuie să fie între 90 și 400 mg $CaCO_3$ per litru la începutul testului (7). Intervalele pentru pH și duritate în apa reconstituită menționată este indicat în metoda

▼M6

de testare C.1 (25). Dacă se estimează o interacțiune între ionii de duritate și substanța testată, atunci trebuie să se utilizeze apă cu o duritate mai mică. Apendicele 4 sintetizează criteriile suplimentare pentru o apă de diluție acceptabilă conform Orientării TG nr. 210 a OCDE (34).

Sediment

28. Calitatea sedimentului trebuie să permită supraviețuirea și, de preferință, reproducerea organismelor de testare în perioada de aclimatizare și pe parcursul testării, fără apariția unui comportament sau aspect anormal. Viermii trebuie să sape galerii în sediment. Comportamentul de săpare de galerii poate influența expunerea și, în consecință, BAF. Prin urmare, tendința de evitare a sedimentului sau comportamentul de săpare de galerii al organismelor de testare trebuie înregistrat, dacă turbiditatea apei acoperitoare permite astfel de observații. Viermii (control și tratamente) trebuie să sape galerii în sediment în 24 de ore de la introducerea în vasele de testare. În cazul în care se observă că în mod permanent nu sapă galerii sau evită sedimentul (de exemplu, peste 20 % timp de peste jumătate din faza de absorbție), aceasta indică faptul că fie condițiile de testare nu sunt adecvate, fie organismele de testare nu sunt sănătoase, fie concentrația substanței testate provoacă acest comportament. În acest caz, testul trebuie oprit și repetat în condiții îmbunătățite. Informații suplimentare privind ingestia de sediment pot fi obținute cu ajutorul metodelor descrise în referințele (35) și (36), în care se specifică ingestia sedimentului sau selectarea particulelor în organismele de testare. Dacă este observabilă, cel puțin prezența sau absența granulelor de fecale pe suprafața sedimentului, care indică ingestie de sediment de către viermi, trebuie înregistrate și luate în considerare pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește căile de expunere.

29. Un sediment artificial bazat pe solul artificial descris în metoda de testare C.8 (40) este recomandat pentru a fi utilizat atât în teste, cât și culturile de laborator ale viermilor (apendicele 5), întrucât sedimentele naturale de calitate adecvată pot să nu fie disponibile pe parcursul întregului an. In plus, organismele indigene precum și posibila prezență a micropoluanților în sedimentele naturale ar putea influența testul. Mai multe specii de testare pot supraviețui, crește și se pot reproduce în sedimentul artificial (8).

30. Sedimentul artificial trebuie să fie caracterizat cel puțin prin originea constituenților, prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de mâl și de argilă), prin conținutul de carbon organic (TOC), prin conținutul de apă și prin pH-ul său. Măsurarea potențialului redox este opțională. Cu toate acestea, sedimentele naturale provenite din locuri nepoluate pot servi drept sediment de testare și/sau de cultură (1). Sedimentele naturale trebuie caracterizate cel puțin prin origine (locul prelevării), pH-ul și conținutul de amoniac din apa interstițială, prin conținutul de carbon organic (TOC), prin distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de mâl și de argilă) și prin procentul de apă (6). Se recomandă ca, înainte de adiționarea cu substanță testată, sedimentul natural să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior, dacă se estimează formarea de amoniac. La finalul acestei perioade de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Analiza micropoluanților din sediment sau din constituenții săi înainte de utilizare ar putea furniza informații utile.

Pregătire

31. Procedurile de manipulare a sedimentelor naturale înainte de utilizarea acestora în laborator sunt descrise în referințele (1), (6) și (44). În apendicele 5 este descrisă prepararea sedimentului artificial.

▼M6

Depozitare

32. Depozitarea sedimentelor naturale în laborator trebuie să fie cât mai scurtă posibil. U.S. EPA (6) recomandă o perioadă de depozitare de maximum 8 săptămâni la 4 ± 2 °C la întuneric. Nu trebuie să existe un spațiul neumplut deasupra sedimentului în recipientele de depozitare. Recomandări pentru depozitarea sedimentului artificial sunt prezentate în apendicele 5.

Aplicarea substanței testate

33. Sedimentul este adiționat cu substanță testată. Procedura de adiționare implică acoperirea unuia sau mai multor constituenți ai sedimentului cu substanța testată. De exemplu, nisipul de cuarț sau o parte a acestuia (de exemplu, 10 g de nisip de cuarț per vas de testare) poate fi irigat cu o soluție a substanței testate într-un solvent adecvat, care este ulterior evaporat lent până la uscare. Fracțiunea acoperită poate fi apoi amestecată cu solul umed. Cantitatea de nisip din amestecul de substanță testată și de nisip trebuie să fie luată în considerare în momentul preparării sedimentului, adică sedimentul trebuie să fie preparat cu mai puțin nisip (6).

34. În cazul sedimentului natural, substanța chimică testată poate fi adăugată prin adiționarea unei porții uscate de sediment conform descrierii de mai sus pentru sedimentul artificial sau prin amestecarea substanței testate în sedimentul umed, cu evaporare ulterioară a oricărui agent de solubilizarea utilizat. Solvenții adecvați pentru adiționarea sedimentului umed sunt etanolul, metanolul, eterul monometilic de etilen glicol, eterul dimetilic de etilen glicol, dimetilformamida și trietilen glicolul (5) (34). Toxicitatea și volatilitatea solventului și solubilitatea substanței testate în solventul ales trebuie să reprezinte principalele criterii pentru selectarea unui agent de solubilizare adecvat. Orientări suplimentare privind procedurile de adiționare sunt furnizate în *Environment Canada* (1995) (41). Trebuie să se procedeze cu grijă astfel încât substanța testată adăugată la sediment să fie distribuită minuțios și uniform în sediment. Subeșantioanele replici ale sedimentului adiționat trebuie analizate pentru a verifica concentrația substanței testate în sediment și pentru a determina gradul de omogenitate al distribuției substanței testate.

35. După pregătirea sedimentului adiționat cu apă acoperitoare, este de dorit să se lase timp pentru migrarea substanței de testate din sediment în faza apoasă. De preferință, aceasta trebuie să se realizeze în condițiile de temperatură și aerare utilizate în test. Perioada de echilibrare corespunzătoare depinde de sediment și de substanță și poate fi de ordinul orelor sau de ordinul zilelor, iar în cazuri rare poate ajunge la câteva săptămâni (4 – 5 săptămâni) (28)(42). În acest test nu este necesar să se aștepte un echilibru complet, însă se recomandă o perioadă de echilibrare cuprinsă între 48 de ore și 7 zile. În funcție de scopul studiului, de exemplu, atunci când trebuie reproduse condițiile de mediu, sedimentul adiționat poate fi echilibrat sau învechit într-o perioadă mai lungă (11).

EFECTUAREA TESTULUI

Testul preliminar

36. Se poate dovedi utilă realizarea unui experiment preliminar pentru optimizarea condițiilor de testare ale testului definitiv, de exemplu selecția concentrației (concentrațiilor) substanței testate și durata fazelor de absorbție și de eliminare. Comportamentul viermilor, de exemplu evitarea sedimentului, adică viermii ies din sediment, care poate fi cauzat de substanța de testare și/sau de însuși sedimentul, trebuie observat și înregistrat

▼M6

pe parcursul unui test preliminar. Evitarea sedimentului poate fi, de asemenea, utilizată ca parametru subletal într-un test preliminar pentru estimarea concentrației (concentrațiilor) substanțe testate în vederea utilizării într-un test de bioacumulare.

Condiții de expunere

Durata fazei de absorbție

37. Organismele testate sunt expuse la substanța testată în timpul fazei de absorbție. Primul eșantion trebuie prelevat la 4 – 24 de ore după începerea fazei de absorbție. Faza de absorbție trebuie să dureze 28 de zile (1) (6) (11), exceptând cazul în care se poate demonstra că echilibrul a fost atins mai devreme. Starea de echilibru apare atunci când: (i) curba factorilor de bioacumulare la fiecare perioadă de eșantionare în raport cu timpul este paralelă cu axa timpului; (ii) trei analize succesive ale BAF realizate pe eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile nu variază mai mult de ± 20 % între ele; și (iii) nu există diferențe semnificative între cele trei perioade de eșantionare (pe baza comparațiilor statistice, de exemplu analiza variației și analiza regresiei). În cazul în care starea de echilibru nu a fost obținută până în ziua 28, faza de absorbție poate fi încheiată prin începerea fazei de eliminare, iar BAF_K poate fi calculat pe baza constantelor vitezelor de absorbție și de eliminare (a se vedea, de asemenea, punctele 16 și 18).

Durata fazei de eliminare

38. Primul eșantion trebuie prelevat la 4 – 24 de ore după începerea fazei de eliminare, deoarece în timpul perioadei inițiale pot să apară schimbări rapide ale reziduul tisular. Terminarea fazei de eliminare se recomandă să fie realizată fie atunci când concentrația substanței testate este mai mică de 10 % din concentrația stării de echilibru, fie după o durată maximă de 10 zile. Nivelul de reziduuri din viermi la sfârșitul fazei de eliminare este raportat ca parametru studiat secundar. Totuși, perioada poate fi determinată de perioada în care concentrația substanței testate din viermi rămâne deasupra limitei de detecție analitice.

Organismele testate

Numărul viermilor testați

39. Numărul de viermi per eșantion trebuie să asigure o masă de țesut de vierme astfel încât masa de substanță de testare per eșantion la începutul fazei de absorbție și, respectiv, la sfârșitul fazei de eliminare, să fie semnificativ mai mare decât limita de detecție pentru substanța testată din materialul biologic. În fazele de absorbție și de eliminare menționate, concentrația din animalele testate este, de obicei, relativ mică (6) (8) (18). Întrucât greutatea individuală pentru multe dintre speciile de oligochete acvatice este foarte mică (5 – 10 mg greutate umedă per individ pentru *Lumbriculus variegatus* și *Tubifex tubifex*), viermii dintr-o cameră de testare replică dată pot fi comasați pentru cântărire și analiza substanței chimice testate. Pentru speciile testate cu o greutate individuală mai mare parte (de exemplu, *Branchiura sowerbyi*) pot fi utilizate camerele de testare replică care conțin un individ, însă în astfel de cazuri trebuie să se crească numărul de replici la cinci pentru fiecare punct de prelevare (11). Totuși, trebuie remarcat faptul că *B. sowerbyi* nu a fost inclusă în testul interlaboratoare (12) și, prin urmare, nu este recomandată ca specie preferabilă pentru această metodă.

40. Trebuie folosiți viermi de dimensiuni similare (pentru *L. variegatus* a se vedea apendicele 6). Ei trebuie să provină din aceeași sursă și trebuie să fie animale adulte sau animale mari aparținând aceleași categorii de vârstă (a se vedea apendicele 6). Greutatea și vârsta unui animal pot avea un efect semnificativ asupra valorilor BAF (de exemplu, datorită conținutului lipidic diferit și/sau a prezenței ouălor); acești parametri trebuie să fie înregistrați cu precizie. Pentru a măsura greutatea umedă și uscată medie, înainte de începerea testului trebuie cântărit un subeșantion de viermi.

▼M6

41. În ceea ce privește *Tubifex tubifex* și *Lumbriculus variegatus*, se estimează că pe parcursul testului va exista reproducere. Lipsa reproducerii în cadrul unui test de bioacumulare trebuie înregistrată și trebuie luată considerare la interpretarea rezultatelor testelor.

Încărcare

42. Trebuie să se utilizeze raporturi sediment-vierme și apă-vierme mari pentru a minimiza reducerea concentrației substanței chimice testate în sediment pe durata fazei de absorbție și pentru a evita scăderea concentrației oxigenului dizolvat. Rata de încărcare aleasă trebuie să corespundă, de asemenea, densităților naturale ale populației pentru specia selectată (43). De exemplu, pentru *Tubifex tubifex*, se recomandă o rată de încărcare de 1 – 4 mg de țesut de vierme (greutate umedă) per gram de sediment umed (8) (11). Referințele (1) și (6) recomandă o rată de încărcare ≤1 g greutate uscată de țesut de vierme per 50 g de carbon organic în sediment pentru *L. variegatus*.

43. Viermii care urmează să fie utilizați în cadrul unui test sunt extrași din cultură prin cernerea sedimentului de cultură. Animalele (adulte sau de mari dimensiuni care nu prezintă semne de fragmentare recentă) sunt transferate în vase din sticlă (de exemplu, plăci Petri) care conțin apă curată. Dacă condițiile de testare diferă de condițiile de cultură, o fază de aclimatizare de 24 de ore trebuie să fie suficientă. Înainte de cântărire, trebuie să fie eliminat excesul de apă de pe viermi. Aceasta se poate realiza prin plasarea cu atenție a viermilor pe șervețele de hârtie preumezite. Nu este recomandat utilizarea de hârtie absorbantă pentru a usca viermii întrucât aceasta poate provoca stres sau deteriorare a viermilor. Brunson et al. (1998) a recomandat utilizarea de viermi neuscați de aproximativ 1,33 ori mai mari decât biomasa vizată. Acestea procent suplimentar de 33 % corespunde diferenței dintre viermii uscați și viermii neuscați (28).

44. La începutul fazei de absorbție (ziua 0 a testului), organismele de testare sunt îndepărtate din camera de aclimatizare și distribuite în mod aleatoriu în vase (de exemplu, plăci Petri) care conțin apă reconstituită prin adăugarea de grupuri de doi viermi în fiecare vas, până când fiecare vas conține zece viermi. Fiecare dintre aceste grupuri de viermi sunt apoi transferate în mod aleatoriu în vase de testare separate, de exemplu folosind un forceps fin din oțel. Vasele de testare sunt ulterior incubate în condițiile de testare.

Hrănire

45. Având în vedere conținutul mic de nutrienți din sedimentul artificial, sedimentul trebuie modificat cu o sursă de hrană. Pentru a nu subestima expunerea organismelor de testare, de exemplu prin alimentarea selectivă cu hrană necontaminată, hrana necesară pentru reproducerea și creșterea organismelor de testare trebuie adăugată în sediment înainte sau pe parcursul aplicării substanței testate (a se vedea apendicele 5).

Raportul sediment-apă

46. Raportul sediment-apă recomandat este de 1:4 (45). Acest raport este considerat adecvat pentru a menține concentrațiilor de oxigen la niveluri adecvate și pentru a evita acumularea de amoniac în apa acoperitoare. Conținutul de oxigen în apa acoperitoare trebuie menținut la o saturație ≥ 40 %. Apa acoperitoare din vasele de testare trebuie aerată ușor (de exemplu 2 – 4 bule pe secundă) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului astfel încât să se limiteze la minimum perturbarea acestuia.

▼M6

Lumina și temperatura

47. Perioada de expunere la lumină a culturii și în cadrul testului este e 16 ore (1) (6). Intensitatea luminii în zona de testare trebuie menținută la aproximativ 500 – 1 000 lux. Temperatura trebuie să fie 20 ± 2 °C pe parcursul întregului test.

Concentrațiile testate

48. O concentrație de testare (cât mai mică posibil) este utilizată pentru determinarea cineticii absorbției, dar poate fi utilizată o a doua concentrație (mai mare) [de exemplu, (46)]. În acest caz, eșantioanele sunt prelevate și analizate la starea de echilibru sau după 28 de zile pentru a confirma BAF măsurat la concentrația mai mică (11). Concentrația mai mare trebuie selectată astfel încât efectele adverse să poată fi excluse (de exemplu, prin alegerea a aproximativ 1 % din cea mai mică concentrație EC_x cunoscută fără efecte cronice, astfel cum rezultă din studiile de toxicitate cronică relevante). Concentrația de testare mai mică trebuie să fie semnificativ mai mare decât limita de detecție din eșantioanele de sedimente și biologice prin metoda analitică utilizată. În cazul în care concentrația substanței testate la care se observă efecte este aproape de limita de detecție analitică, se recomandă utilizarea unei substanței testate marcate radioactiv cu o radioactivitate specifică mare.

Replicile tratate și de control

49. Numărul minim de replici tratate pentru măsurătorile cinetice trebuie să fie de trei pe punct de prelevare (11) pe durata fazelor de absorbție și de eliminare. Trebuie utilizate replici suplimentare, de exemplu pentru date de eșantionare suplimentare opționale. Pentru faza de eliminare, un număr corespunzător de replici este pregătit cu sedimente neadiționate și apă acoperitoare, astfel încât viermii tratați să poată fi transferați din vasele tratate desemnate în vase netratate la sfârșitul fazei de absorbție. Numărul total de replici tratate trebuie să fie suficient atât pentru faza de absorbție, cât și pentru faza de eliminare.

50. Ca alternativă, viermii desemnați pentru eșantionare pe durata fazei de eliminare pot fi expuși într-un recipient mare conținând sediment adiționat din același lot ca cel utilizat pentru cinetica absorbției. Trebuie să se demonstreze că condițiile de testare (de exemplu, adâncimea sedimentului, raportul sediment-apă, încărcarea, temperatura, calitatea apei) sunt comparabile cu cele ale replicilor desemnate pentru faza de absorbție. La sfârșitul fazei de absorbție, eșantioanele de apă, de sediment și de viermi trebuie prelevate din acest recipient pentru analiză și un număr suficient de viermi mari care nu prezintă semne de fragmentare recentă trebuie îndepărtați cu grijă și transferați în replicile pregătite pentru faza de eliminare (de exemplu, 10 organisme per vas replică).

51. În cazul în care nu este utilizat niciun alt solvent în afară de apă, trebuie asigurate cel puțin 9 replici cu control negativ (cel puțin 3 eșantionate la început, 3 la sfârșitul absorbției și 3 la sfârșitul eliminării) pentru o analiză biologică și de fond. În cazul în care se utilizează vreun agent de solubilizare pentru aplicarea substanței testate, un solvent de control ar trebui să fie utilizat (trebuie eșantionate cel puțin 3 replici la început, 3 la sfârșitul fazei de absorbție și 3 la sfârșitul fazei de eliminare). În acest caz, trebuie asigurate cel puțin 4 replici cu control negativ (fără solvent) pentru eșantionare la sfârșitul fazei de absorbție. Aceste replici pot fi comparate din punct de vedere biologic cu solventul de control pentru a se obține informații privind posibila influență a solventului asupra organismelor de testare. Detalii sunt incluse în apendicele 3.

▼M6

Frecvența de măsurare a calității apei

52. Ca o condiție minimă, următorii parametri privind calitatea apei trebuie măsurați în apa acoperitoare pe parcursul fazei de absorbție și al fazei de eliminare:

Temperatura	în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament pentru fiecare dată de eșantionare și în unul dintre vasele de control o dată pe săptămână și la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare; temperatura în mediul înconjurător (aerul ambiental sau baia de apă) sau în unul dintre vasele de testare reprezentative poate fi, de asemenea, înregistrată, de exemplu în intervale continue sau orare;
Conținutul de oxigen dizolvat	în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament și în unul dintre vasele de control pentru fiecare dată de eșantionare; exprimat în mg/L și % ASV (valoarea de saturație din aer);
Alimentarea cu aer	controlată cel puțin o dată pe zi (zile lucrătoare) și ajustată, dacă este necesar;
pH	în unul dintre vasele aferente fiecărui nivel de tratament pentru fiecare data de eșantionare și în unul dintre vasele de control o dată pe săptămână și la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare;
Duritatea totală a apei	cel puțin în unul dintre vasele de tratament și în unul dintre vasele de testare de control la începutul și la sfârșitul fazei de absorbție și eliminare, exprimată ca mg/l $CaCO_3$;
Conținutul total de amoniac	cel puțin în unul dintre vasele de tratament și în unul dintre vasele de testare de control la începutul și la sfârșitul perioadei de absorbție și de eliminare; exprimat ca mg/l NH_4^+ sau NH_3 sau total amoniac-N.

Eșantionarea și analiza viermilor, a sedimentului și a apei

Calendarul eșantionării

53. Exemple de programe de eșantionare pentru o fază de absorbție de 28 de zile și o fază de eliminare de 10 zile sunt prezentate în apendicele 3.

54. Se prelevează eșantioane de apă și de sediment din camerele de testare pentru determinarea concentrației substanței testate înainte de introducerea viermilor și pe parcursul fazelor de absorbție și de eliminare. Pe durata testării, se determină concentrațiile substanței testate din viermi, sediment și apă cu scopul de a monitoriza distribuirea substanței testate în compartimentele sistemului de testare.

55. Se prelevează eșantioane de viermi, de sediment și de apă de cel puțin șase ori pe durata fazei de absorbție și a fazei de eliminare.

56. Se continuă eșantionarea până la stabilirea unui platou (starea de echilibru) (a se vedea apendicele 1) sau timp de 28 de zile. În cazul în care platoul nu a fost atins până în ziua 28, se începe faza de eliminare. La începerea fazei de eliminare, se transferă viermii desemnați în camere replică care conțin sediment și apă netratate (a se vedea, de asemenea, punctele 17 și 18).

Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor

57. Se obțin eșantioane de apă prin decantare, sifonare sau pipetarea unui volum suficient pentru măsurarea cantității substanței testate din eșantion.

58. Apa acoperitoare rămasă este decantată sau sifonată cu atenție din camera (camerele de testare). Eșantioanele de sediment trebuie prelevate cu atenție, astfel încât viermii să fie perturbați la minimum.

▼M6

59. Se îndepărtează toți viermii din vasele de testare replică în momentul eșantionării, de exemplu prin suspendarea sedimentului și a apei acoperitoare și răspândirea conținutului fiecărei replici pe o tavă de mică adâncime, culegând viermii cu ajutorul unui forceps fin din oțel. Viermii se clătesc rapid cu apă pe o tavă de mică adâncime din sticlă sau din oțel. Se îndepărtează excesul de apă. Se transferă cu atenție viermii într-un vas precântărit și se cântăresc. Se sacrifică viermii prin înghețare (de exemplu la ≤ – 18 °C). Prezența și numărul de coconi și/sau de exemplare tinere trebuie înregistrate.

60. În general, viermii trebuie cântăriți și sacrificați imediat după prelevare în absența unei faze de purjare intestinală pentru a obține un BAF conservator care să includă conținut intestinal contaminat, precum și pentru a evita pierderile de reziduuri ale corpului în timpul unei perioade de purjare a intestinelor numai în apă (8). Este de așteptat că substanțele cu log K_{ow} mai mare de 5 nu se elimină în mod semnificativ în cursul unei perioade de purjare intestinală numai în apă, în timp ce substanțele cu log K_{ow} mai mic de 4 pot fi pierdute în cantități importante (47).

61. În timpul fazei de eliminare, viermii își curăță intestinele în sedimentul curat. Aceasta înseamnă că măsurătorile efectuate imediat înainte de faza de eliminare includ sediment contaminat cu excreții, în timp ce după perioada inițială de 4 – 24 de ore a fazei de eliminare, cea mai mare parte a conținutului contaminat cu excreții se presupune că este înlocuit cu sediment curat (11) (47). Concentrația din viermii din acest eșantion poate fi apoi considerată drept concentrația tisulară după purjare intestinală. Pentru a ține cont de diluția concentrației substanței testate de sedimentul necontaminat în timpul fazei de eliminare, greutatea conținutului intestinal poate fi estimată din raportul greutate umedă vierme/greutate cenușă vierme sau din raportul greutate uscată vierme/greutate cenușă vierme.

62. În cazul în care scopul unui studiu specific este de a măsura biodisponibilitatea și reziduurile tisulare reale din organismele de testare, atunci cel puțin un subeșantion de animale tratate (de exemplu, din trei vase replică suplimentare), de preferință eșantionate pe parcursul stării de echilibru, trebuie cântărite, purjate în apă curată pentru o perioadă de 6 ore (de 47 de) și cântărite din nou înainte de analiză. Datele privind greutatea viermilor și concentrația din corp pentru acest subeșantion pot fi ulterior comparate cu valorile obținute pentru viermi nepurjați. Viermii desemnați pentru măsurarea eliminării nu trebuie purjați înainte de transferul în sedimentul curat pentru a minimiza stresul suplimentar pentru animale.

63. De preferință, eșantioanele de apă, de sediment și de viermi se analizează imediat (adică în termen de 1 – 2 zile) după îndepărtare pentru a preveni degradarea sau alte pierderi și pentru a calcula vitezele aproximative de absorbție și de eliminare pe măsură ce testul avansează. O analiză imediată determină și evitarea întârzierilor în stabilirea momentului în care a fost atins un platou.

64. În cazul în care nu este efectuată o analiză imediată, eșantioanele trebuie depozitate în condiții adecvate. Se obțin informații privind stabilitatea și condițiile de depozitare adecvate pentru substanța testată în cauză înainte de începerea studiului (de exemplu, durata și temperatura de depozitare, procedurile de extragere etc.). Dacă astfel de informații nu sunt disponibile, dar sunt considerate necesare, pot fi utilizate simultan țesuturi de control adiționate pentru a determina stabilitatea la depozitare.

Calitatea metodei analitice

65. Întrucât întreaga procedură este determinată, în principal, de acuratețea, precizia și sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru substanța testată, trebuie verificat în mod experimental că precizia și reproductivitatea analizei chimice, precum și recuperarea substanței testate din eșantioanele de apă, de sediment și de viermi sunt pe deplin satisfăcătoare în cazul particular al

▼M6

respectivei metode. De asemenea, trebuie să se verifice că substanța testată nu poate fi detectată în camerele de control la concentrații mai mari decât cele de fond. Dacă este necesar, se corectează valorile C_w, C_s și C_a pentru valorile de control pentru recuperări și de fond. Pe întreaga durată a testului, toate eșantioanele trebuie manipulate astfel încât să se minimizeze contaminarea și pierderile (rezultate, de exemplu, din absorbția substanței testate pe dispozitivul de eșantionare).

66. Recuperarea totală și recuperarea substanței testate din viermi, din sediment și din apă și, dacă se utilizează, din captatoarele care conțin absorbanți pentru a reține substanța testată evaporată, trebuie înregistrate și raportate.

67. Întrucât se recomandă utilizarea de substanțe marcate radioactiv, este posibil să se analizeze radioactivitatea totală (produși parentali și de degradare). Totuși, dacă este fezabilă din punct de vedere analitic, cuantificarea substanței parentale și a produșilor de degradare în starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție poate furniza informații importante. Dacă se intenționează efectuarea unor astfel de măsurători, eșantioanele trebuie apoi supuse unor proceduri adecvate de extragere, astfel încât substanța parentală să poate fi cuantificată separat. Atunci când un produs de degradare detectat reprezintă un procent semnificativ (de exemplu, > 10 %) din radioactivitatea măsurată în organismele de testare în starea de echilibru sau la sfârșitul fazei de absorbție, se recomandă identificarea respectivilor produși de degradare (5).

68. Ca urmare a unei biomase individuale mici, de multe ori nu este posibil să se determine concentrația substanței testate din fiecare vierme individual, cu excepția cazului în care ca specie de testare este folosită specia *Branchiura sowerbyi* (40 – 50 mg greutate umedă per vierme) (11). Prin urmare, comasarea indivizilor eșantionați dintr-un anumit vas de testare este acceptabilă, însă aceasta restrânge procedurile statistice care pot fi aplicate datelor. În cazul în care o procedură statistică specifică și puterea reprezintă considerente importante, atunci trebuie incluse în test un număr adecvat de animale de testare și/sau de camere de testare replică pentru a putea obține agregarea, procedura și puterea dorite.

69. Se recomandă ca BAF să fie exprimat atât în funcție de greutatea umedă totală, de greutatea uscată totală și, dacă este necesar (de exemplu, pentru substanțele foarte lipofile) în funcție de conținutul de lipide și de TOC din sediment. Pentru determinarea conținutului de lipide trebuie utilizate metode adecvate (48) (49). Se poate recomanda tehnica de extragere cu cloroform/metanol (50), ca metodă standard (48). Totuși, pentru a evita utilizarea solvenților clorurați, poate fi utilizată o modificare testată interlaboratoare a metodei Bligh și Dyer (50) astfel cum este descrisă în (51). Întrucât metodele diferite nu oferă rezultate identice (48), este important să se precizeze detaliile metodei utilizate. Ori de câte ori este posibil, adică atunci când este disponibil suficient țesut de vierme, măsurarea conținutului de lipide se realizează pe aceleași eșantioane sau extracte ca cele produse pentru analiza substanței chimice testate, întrucât, adesea, lipidele trebuie îndepărtate din extras înaintea analizării prin cromatografie (5). Totuși, este practic să se utilizeze animale de control aclimatizate cel puțin la începutul sau – de preferință – la sfârșitul fazei de absorbție în vederea măsurării conținutului de lipide, de exemplu în trei eșantioane.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

70. Curba de absorbție a substanței testate este obținută prin trasarea la scală aritmetică a concentrației substanței testate în/pe viermi pe parcursul fazei de

▼M6

absorbție în funcție de timp. În cazul în care curba a ajuns la un platou, se calculează BAF_{ss} pentru starea de echilibru:

$$\frac{C_a \text{ la starea de echilibru sau în ziua } 28(\text{medie})}{C_s \text{ la starea de echilibru sau în ziua } 28(\text{medie})}$$

71. Se determină factorul de bioacumulare cinetică (BAFK) ca raport între k_s/k_e. Constanta de eliminare (k_e) se determină de obicei din curba de eliminare (adică o curbă a concentrației substanței testate din viermi pe parcursul fazei de eliminare). Constanta vitezei de absorbție ks este apoi calculată din cinetica curbei de absorbție. Metoda preferată pentru obținerea BAF_K și a constantelor vitezelor k_s și k_e este utilizarea metodelor computerizate de estimare a parametrilor neliniari (a se vedea apendicele 2). Dacă este evident că eliminarea nu este de ordinul întâi, atunci trebuie utilizate modele mai complexe (25) (27) (52).

72. Factorul de acumulare biotă-sediment (BSAF) este determinat prin normalizarea BAFK pentru conținutul de lipide din viermi și pentru conținutul total de carbon organic din sediment.

Interpretarea rezultatelor

73. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție, atunci când concentrațiile măsurate ale concentrațiilor de testare se află la niveluri apropiate de limita de detecție a metodei de analiză utilizate.

74. Curbele de absorbție și de eliminare clar definite constituie o indicație a bunei calități a datelor referitoare la bioacumulare. În general, limitele de încredere pentru valorile BAF din studii bine concepute nu trebuie să depășească 25 % (5).

Raportul privind testul

75. Raportul privind testul trebuie să includă următoarele informații:

Substanța testată

— natura fizică și proprietățile fizico-chimice, de exemplu log K_{ow}, solubilitatea în apă;

— date de identificare a substanței chimice; sursa substanței chimice testate, identitatea și concentrația oricărui solvent utilizat;

— în cazul marcării radioactive, poziția precisă a atomilor marcați, radioactivitatea specifică și procentul de radioactivitate asociată cu impuritățile.

Speciile folosite pentru testare

— denumire științifică, tulpină, sursă, orice pretratament, aclimatizare, vârstă, gama de dimensiuni etc.

Condițiile de testare

— procedura de testare utilizată (de exemplu, statică, semistatică sau cu flux continuu);

— tipul și caracteristicile iluminării utilizate și perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— protocolul de testare (de exemplu, numărul, materialul și dimensiunea camerelor de testare, volumul de apă, masa și volumul sedimentului, rata de înlocuire a volumului de apă (pentru procedurile cu flux continuu sau semistatice), orice aerare utilizată înainte și pe parcursul testului, numărul de replici, numărul de viermi per replică, numărul de concentrații de testare, durata fazelor de absorbție și de eliminare, frecvența eșantionării);

▼M6

— metoda de preparare și aplicare a substanței testate, precum și motivele alegerii unei metode specifice;

— concentrațiile de testare nominale;

— sursa constituenților apei și sedimentului artificial sau – în cazul în care se utilizează medii naturale – originea apei și a sedimentului, descrierea oricărui tratament prealabil, rezultatele oricărei demonstrații a capacității animalelor de testare de a trăi și/sau de a se reproduce în mediile utilizate, caracteristicile sedimentului [pH-ul și amoniacul din apa interstițială (sediment natural), conținutul de carbon organic (TOC), distribuția dimensiunii particulelor (procentul de nisip, de mâl și de argilă), procentul conținutului de apă, precum și orice alte măsurători efectuate] și caracteristicile apei [pH, duritate, conductivitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual (dacă se măsoară), precum și orice alte măsurători efectuate];

— greutatea uscată nominală și măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) a sedimentului artificial; greutatea uscată măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) pentru sediment natural;

— calitatea apei din camerele de testare caracterizată prin temperatură, pH, amoniac, duritatea totală și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații detaliate privind tratamentul eșantioanelor de apă, de sediment și de viermi, inclusiv detalii privind pregătirea, depozitarea, procedurile de adiționare, extragerea și procedurile analitice (și precizia) pentru substanța testată și conținutul de lipide, precum și recuperările substanței testate.

Rezultate

— mortalitatea în rândul viermilor de control și al viermilor din fiecare cameră de testare și orice efecte subletale observate inclusiv orice comportament anormal (de exemplu, evitarea sedimentului, prezența sau absența granulelor de fecale, lipsa reproducerii);

— greutatea uscată măsurată în % din greutatea umedă (sau raportul greutate uscată-greutate umedă) a sedimentului și a organismelor de testare (utilă pentru normalizare);

— conținutul de lipide din viermi;

— curbe care indică cinetica de absorbție și de eliminare ale substanței testate în viermi și timpul până la starea de echilibru;

— C_a, C_s și C_w (împreună cu deviația standard și intervalul, dacă este cazul) pentru toate momentele de eșantionare (C_a exprimată în g kg^{-1} greutate umedă și uscată a întregului organism, C_s exprimată în g kg^{-1} greutate umedă și uscată a sedimentului și C_w exprimată în mg l^{-1}). În cazul în care este necesar un factor de acumulare biotă-sediment (BSAF; a se vedea apendicele 1 pentru definiție) (de exemplu pentru compararea rezultatelor obținute din două sau mai multe teste efectuate cu animale cu conținut diferit de lipide), C_a trebuie exprimată suplimentar ca g kg^{-1} conținut de lipide din organism, iar C_s trebuie exprimată ca g kg^{-1} carbon organic (CO) din sediment;

— BAF (exprimat în kg de sediment umed kg^{-1} viermii umezi), constanta vitezei de absorbție din sediment k_s (exprimată în g sediment umed kg^{-1} viermii umezi d^{-1}), precum și constanta vitezei de eliminare k_e (exprimată în d^{-1}); BSAF (exprimat în kg sediment CO kg^{-1} conținut de lipide din viermi) poate fi raportat suplimentar;

▼**M6**

— Reziduuri neeliminate (NER) la sfârșitul fazei de eliminare;

— dacă sunt măsurate: procentele de substanță parentală, de produși de degradare și de reziduuri legate (adică, procentul de substanță testată care nu poate fi extrasă cu metodele de extragere comune) detectate la animalele de testare;

— metodele utilizate pentru analizele statistice ale datelor.

Evaluarea rezultatelor

— conformitatea rezultatelor cu criteriile de validitate enumerate la punctul 21;

— rezultate neprevăzute sau neobișnuite, de exemplu eliminarea incompletă a substanței testate din animalele de testare; în astfel de cazuri rezultatele obținute din orice studii preliminare pot furniza informații utile.

▼M6

Apendicele 1

Definiții și unități

Sedimentul artificial, sau sedimentul formulat, reconstituit sau sintetic, este un amestec de materiale utilizate pentru simularea componentelor fizice ale unui sediment natural.

Bioacumularea este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism în raport cu concentrația acestei substanțe testate în mediul înconjurător. Bioacumularea rezultă atât din procesul de bioconcentrare, cât și din cel de bioamplificare (a se vedea mai jos).

Factorul de bioacumulare (*bioaccumulation factor* – BAF) în orice moment pe parcursul fazei de absorbție a acestui test de bioacumulare este concentrația substanței testate în/pe organismul testat (C_a în g kg^{-1} greutate umedă sau uscată) împărțită la concentrația substanței în mediul înconjurător (C_s ca g kg^{-1} greutate umedă sau uscată a sedimentului). Pentru referirea la unitățile C_a și C_s, BAF este exprimat în unități de kg sediment kg^{-1} vierme (15).

Factorii de bioacumulare calculați direct din raportul dintre constanta vitezei de absorbție din sediment împărțită la constantele vitezei de eliminare (k_s și, respectiv, k_e – a se vedea mai jos) sunt denumite factor de bioacumulare cinetică (*kinetic bioaccumulation factor* – BAF_K).

Bioconcentrarea este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism, care rezultă exclusiv din absorbția prin intermediul suprafeței organismului, în raport cu concentrația acestei substanțe testate din mediul înconjurător.

Bioamplificarea este creșterea concentrației substanței testate în sau pe un organism, care rezultă în principal din absorbția din alimente sau pradă contaminate, în raport cu concentrația substanței testate în hrană sau în pradă. Bioamplificarea poate duce la un transfer sau la o acumulare a substanței testate în rețelele trofice.

Factorul de acumulare biotă-sediment (*biota-sediment accumulation factor* – BSAF) este concentrația stabilizată normalizată pentru lipide a substanței testate în/pe organismul testat împărțită la concentrația normalizată pentru carbon organic a substanței în sediment la starea de echilibru. C_a este apoi exprimată ca g kg^{-1} conținut de lipide al organismului, iar C_s ca kg^{-1} conținut organic al sedimentului.

Perioada de condiționare este utilizată pentru stabilizarea componentei microbiene a sedimentului și pentru eliminarea, de exemplu, a amoniacului provenit din componentele sedimentului; ea se derulează înainte de adiționarea sedimentului cu substanța testată. De obicei, apa acoperitoare este eliminată după condiționare.

Eliminarea unei substanțe testate înseamnă pierderea de substanță din țesutul organismului de testare prin procese active sau pasive care se produc independent de prezența substanței testate în mediul înconjurător.

Faza de eliminare este timpul, după transferul organismelor de testare dintr-un mediu contaminat într-un mediu în care nu se află substanța testată, pe parcursul căruia se studiază eliminarea (sau pierdere netă) substanței din organismele de testare.

Constanta vitezei de eliminare (k_e) este valoarea numerică care definește viteza de scădere a concentrației substanței testate în/pe organismul de testare, după transferul organismelor de testare dintr-un mediu care conține substanța testată într-un mediu fără substanțe chimice; k_e este exprimată ca d^{-1}.

▼M6

Perioada de echilibrare este utilizată pentru a permite distribuirea substanței testate între faza solidă, apa interstițială și apa acoperitoare; ea se derulează după adiționarea sedimentului cu substanța testată și înainte de adăugarea organismelor de testare.

Coeficientul de partiție octanol-apă (K_{ow}) este raportul dintre solubilitatea unei substanțe în n-octanol și în apă la echilibru, exprimată uneori și ca P_{ow}. Logaritmul lui K_{ow} (log K_{ow}) este utilizat ca indicator al potențialului de bioacumulare al unei substanțe în organismele acvatice.

Coeficientul de partiție carbon organic-apă (K_{oc}) este raportul dintre concentrația unei substanțe în/pe fracția de carbon organic a unui sediment și concentrația substanței în apă la echilibru.

Apa acoperitoare este apa care acoperă sedimentul în vasul de testare.

Platoul sau **starea de echilibru** înseamnă echilibrul între procesele de absorbție și de eliminare care apare simultan în timpul fazei de expunere. Starea de echilibru este atinsă în graficul BAF pentru fiecare perioadă de eșantionare în funcție de timp atunci când curba devine paralelă cu axa timpului, iar trei analize succesive ale BAF realizate asupra unor eșantioane prelevate la intervale de cel puțin două zile se mențin într-un interval de 20 % una față de alta și nu există diferențe statistic semnificative între cele trei perioade de eșantionare. Pentru substanțele testate care se absorb lent, intervalele cele mai adecvate ar fi de șapte zile (5).

Apa interstițială este apa care ocupă spațiul dintre particulele de sediment sau de sol.

Constanta vitezei de absorbție din sediment (k_s) reprezintă valoarea numerică care definește viteza de creștere a concentrației substanței testate în/pe organismul testat care rezultă din absorbția din sediment. k_s se exprimă în g sediment kg^{-1} de vierme d^{-1}.

Sedimentul adiționat este sedimentul în care se adaugă substanța testată.

Factorul de bioacumulare la starea de echilibru (BAF_{ss}) este BAF la starea de echilibru și nu se modifică în mod semnificativ în cursul unui interval lung de timp, concentrația substanței testate în mediul înconjurător (C_s exprimată ca g kg^{-1} greutate uscată sau umedă de sediment) fiind constantă în acest interval de timp.

Faza de absorbție sau de eliminare înseamnă timpul în care organismele testate sunt expuse la substanța testată.

▼M6

Apendicele 2

Calculul parametrilor de absorbție și de eliminare

Principalul parametru studiat al unui test de bioacumulare este factorul de bioacumulare, BAF. BAF măsurat poate fi calculat prin împărțirea concentrației substanței testate în organismul de testare, C_a, la concentrația substanței testate din sediment, C_s, la starea de echilibru. În cazul în care starea de echilibru nu se atinge în timpul fazei de absorbție, BAF se calculează în același mod pentru ziua 28. Cu toate acestea, ar trebui să se indice dacă BAF se bazează sau nu pe concentrațiile la starea de echilibru.

Mijlocul preferat de obținere a factorului de bioacumulare cinetică (BAF_K), a constantei vitezei de absorbție din sediment (k_s) și a constantei vitezei de eliminare (k_e) este recurgerea la metode computerizate de estimare a parametrilor neliniari. Dată fiind seria de timp a factorilor de acumulare medii (Ca, valorile medii ale fiecărei date de eșantionare/C_s, valorile medii ale fiecărei date de eșantionare = AF) a fazei de absorbție în funcție de greutatea umedă a viermelui și a sedimentului, și ecuația model

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ecuația 1]}$$

unde AF(t) este raportul dintre concentrația substanței testate în viermi și concentrația acesteia în sediment în orice moment (t) pe parcursul fazei de absorbție, aceste programe informatice calculează valorile BAF_K, k_s și k_e.

Atunci când se atinge starea de echilibru pe parcursul fazei de absorbție (i.e. t = ∞), ecuația 1 poate fi redusă la:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ecuația 2]}$$

unde

k_s = constanta vitezei de absorbție în țesut [g sediment kg^{-1} din vierme d^{-1}]

k_e = constanta vitezei de eliminare [d^{-1}]

Atunci $k_s/k_e \times C_s$ reprezintă o metodă de obținere a concentrației substanței testate în țesutul de vierme la starea de echilibru ($C_{a,ss}$).

Factorul de acumulare biotă-sediment (BSAF) trebuie calculat astfel:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

unde foc este fracțiunea de carbon organic din sediment, iar flip este fracțiunea de conținut de lipide din vierme, ambele bazate pe greutatea uscată sau pe greutatea umedă.

Data fiind o serie de timp a valorilor concentrațiilor, cinetica eliminării poate fi modelată folosind următoarele ecuații model și o metodă computerizată de estimare a parametrilor neliniari.

Media măsurată a reziduului corporal la sfârșitul fazei de absorbție este recomandată ca punct de pornire implicit. Valoarea modelată/estimată din faza de absorbție trebuie folosită numai dacă, de exemplu, valoarea măsurată se abate semnificativ de la valoarea reziduului corporal modelat. A se vedea, de asemenea, punctul 50 pentru preexpunerea alternativă a viermilor desemnați pentru eliminare; cu această metodă, eșantioanele din acești viermi preexpuși în ziua 0 a fazei de eliminare se consideră că oferă o valoare realistă a reziduului corporal cu care se începe eliminarea cinetică.

▼M6

Dacă punctele aferente datelor reprezentate grafic în funcție de timp indică o scădere exponențială constantă a concentrației substanței testate în animale, poate fi utilizat un model cu un compartiment (ecuația 4) pentru a descrie evoluția temporală a eliminării.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ecuația 3]}$$

Uneori, procesele de eliminare par a se derula în două etape, indicând o scădere rapidă a C_a în timpul etapelor timpurii, care se modifică în sensul unei pierderi mai lente de substanțe testate în fazele mai târzii ale eliminării (8) (19) (25). Cele două etape pot fi interpretate plecând de la ipoteza că în organism există două compartimente diferite din care substanța testată se elimină cu viteză diferită. În aceste cazuri, trebuie studiată literatura relevantă (15) (16) (17) (25).

O eliminare din două compartimente este descrisă, de exemplu, prin următoare ecuație (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ecuația 4]}$$

A și B reprezintă dimensiunea compartimentelor (în procente de reziduu tisular general), unde A este compartimentul cu pierdere rapidă de substanță, iar B compartimentul cu pierdere lentă a substanței testate. Suma A și B este egală cu 100 % din volumul întregului compartiment de animal la starea de echilibru. k_a și k_b reprezintă constantele de eliminare corespunzătoare [d^{-1}]. Dacă modelul cu două compartimente este aplicat datelor privind depurarea, constanta vitezei de absorbție k_s poate fi determinată după cum urmează (53) (54):

$$k_s = \frac{\left(A \times k_a + B \times k_b\right) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[ecuația 5]}$$

Cu toate acestea, aceste ecuații model trebuie folosite cu prudență, în special atunci când în timpul testului au loc modificări ale biodisponibilității substanței testate (42).

Ca alternativă la ecuațiile model descrise mai sus, parametrii cinetici (k_s și k_e) pot fi calculați și într-o singură etapă, aplicând modelul cineticii de ordinul întâi tuturor datelor obținute din faza de absorbție și din cea de eliminare împreună. Pentru o descriere a unei metode care ar putea permite un astfel de calcul combinat al constantelor vitezei de absorbție și de eliminare, pot fi consultate referințele (55), (56) și (57).

Reziduurile neeliminate (NER) trebuie calculate ca parametru studiat secundar prin înmulțirea raportului dintre concentrația medie din viermi (C_a) în ziua 10 a fazei de eliminare și concentrația medie din viermi (C_a) la starea de echilibru (ziua 28 a fazei de absorbție) cu 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%]} = \frac{\boldsymbol{C_a la\ finalul\ eliminării(medie)} \times \mathbf{100}}{\boldsymbol{C_a la\ starea\ de\ echilibru(medie)}}$$

▼M6

Apendicele 3

Exemplu de program de eșantionare pentru un test de bioacumulare de 28 de zile

a) **Faza de absorbție (inclusiv o fază de echilibrare de 4 zile)**

Ziua	Activități
– 6	Pregătirea suspensiei de turbă pentru sediment; condiționarea suspensiei timp de 48 de ore;
– 4	Adiționarea sedimentului sau a unei părți din sediment; amestecarea tuturor constituenților sedimentului; îndepărtarea eșantioanelor de sediment din sedimentul tratat și din cel de control cu solvent pentru determinarea concentrației substanței de testare; adăugarea de apă acoperitoare; incubarea în condiții de testare (faza de echilibrare);
– 3/– 2	Separarea organismelor de testare din cultură pentru aclimatizare;
0	Măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); îndepărtarea replicilor pentru prelevarea de eșantioane de apă și de sediment pentru determinarea concentrației substanței testate; distribuirea în mod aleatoriu a viermilor în camerele de testare; reținerea unor subeșantioane suficiente de viermi pentru determinarea valorilor analitice de fond; controlarea alimentării cu aer, dacă se utilizează un sistem de testare închis;
1	Îndepărtarea replicilor pentru eșantionare; controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor, a calității apei (a se vedea punctul 56); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate;
2	Controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii;
3	La fel ca în ziua 1;
4 – 6	La fel ca în ziua 2;
7	La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;
8 – 13	La fel ca în ziua 2;
14	La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;
15 – 20	La fel ca în ziua 2;
21	La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;
22 – 27	La fel ca în ziua 2;
28	La fel ca în ziua 1; măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); sfârșitul fazei de absorbție; reținerea unor subeșantioane suficiente de viermi pentru determinarea valorilor analitice de fond, a greutății umede și uscate și a conținutului de lipide; transferarea viermilor din replicile expuse rămase în vase care conțin sediment curat pentru faza de eliminare (fără purjare intestinală); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi din vasele de control cu solvent; eșantionarea soluțiilor de captare, dacă sunt instalate.
	Activitățile de preexpunere (faza de echilibrare) trebuie programate ținând cont de proprietățile substanței testate. Dacă este necesar, se condiționează sedimentul preparat sub apa acoperitoare la 20 ± 2 °C timp de 7 zile; în acest caz, este necesară prepararea mai timpurie a sedimentului!
	Activitățile descrise pentru ziua 2 trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).

▼**M6**

b) **Faza de eliminare**

Ziua	Activități
– 6	Pregătirea suspensiei de turbă pentru sediment; condiționarea suspensiei timp de 48 de ore;
– 4	Amestecarea tuturor constituenților sedimentelor; îndepărtarea eșantioanelor de sediment din sedimentul tratat și din cel de control cu solvent pentru determinarea concentrației substanței de testare; adăugarea de apă acoperitoare; incubarea în condiții de testare;
0 (ziua 28 a fazei de absorbție)	Măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); transferarea viermilor din replicile expuse rămase în vase care conțin sediment curat; îndepărtarea după **4 – 6 ore** a replicilor pentru prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate; distribuirea în mod aleatoriu a viermilor în camerele de testare;
1	Îndepărtarea replicilor pentru eșantionare; controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor, a calității apei (a se vedea punctul 52); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi pentru determinarea concentrației substanței testate;
2	Controlarea alimentării cu aer, a comportamentului viermilor și a temperaturii;
3	La fel ca în ziua 1;
4	La fel ca în ziua 2;
5	La fel ca în ziua 1;
6	La fel ca în ziua 2;
7	La fel ca în ziua 1; se compensează apa evaporată, dacă este necesar;
8 – 9	La fel ca în ziua 2;
10	La fel ca în ziua 1; sfârșitul fazei de eliminare; măsurarea calității apei (a se vedea punctul 52); prelevarea de eșantioane de apă, de sediment și de viermi din vasele de control cu solvent; eșantionarea soluțiilor de captare, dacă sunt instalate.
	Prepararea sedimentului înainte de începerea fazei de eliminare trebuie realizată în același mod ca înainte de faza de absorbție.
	Activitățile descrise pentru ziua 2 trebuie realizate zilnic (cel puțin în zilele lucrătoare).

▼**M6**

Apendicele 4

Câteva caracteristici fizico-chimice ale unei apei de diluție acceptabile

CONSTITUENT	CONCENTRAȚII
Materie sub formă de particule	< 20 mg/l
Carbon organic total	< 2 µg/l
Amoniac neionizat	< 1 µg/l
Clor rezidual	< 10 µg/l
Pesticide organofosforice totale	< 50 ng/l
Total pesticide organofosforice plus bifenili policlorurați	< 50 ng/l
Clor organic total	< 25 ng/l

COMPOZIȚIA APEI RECONSTITUITE RECOMANDATE

(a) Soluție de clorură de calciu

Se dizolvă 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(b) Soluție de sulfat de magneziu

Se dizolvă 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(c) Soluție de bicarbonat de sodiu

Se dizolvă 2,59 g de $NaHCO_3$ în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

(d) Soluție de clorură de potasiu

Se dizolvă 0,23 g de KCl în apă deionizată; se completează până la 1 l cu apă deionizată

Toate substanțele chimice trebuie să fie de puritate analitică.

Conductivitatea apei distilate sau deionizate nu trebuie să depășească 10 μScm^{-1}.

Se amestecă 25 ml din fiecare dintre soluțiile menționate la litere (a) – (d) și se completează volumul total până la 1 litru cu apă deionizată. Suma ionilor de calciu și de magneziu din aceste soluții este de 2,5 mmol/l.

Proporția de ioni Ca:Mg este de 4:1, iar cea de ioni Na:K este de 10:1. Capacitatea acidă $K_{S4.3}$ a acestei soluții este de 0,8 mmol/l.

Se aerează apa de diluție până la obținerea saturației în oxigen, apoi se depozitează pentru o perioadă de aproximativ două zile fără o altă aerare înainte de utilizare.

pH-ul unei apei de diluție acceptabile trebuie să se încadreze între 6 și 9.

▼M6

Apendicele 5

Sedimentul artificial – recomandări privind prepararea și depozitarea

Spre deosebire de cerințele metodei de testare C.8 (40), se recomandă ca respectivul conținut de turbă din sedimentul artificial să fie de 2 % în loc de 10 % din greutatea uscată, pentru a corespunde unui conținut de carbon organic mic spre mediu în sedimentele naturale (58).

Procentul de constituenți uscați ai sedimentului artificial:

Constituent	Caracteristici	% din sedimentul uscat
Turbă	Mușchi de turbă Sphagnum, grad de descompunere: „mediu”, uscat cu aer, fără reziduuri vizibile de plante, fin măcinat (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Nisip de cuarț	Dimensiunea granulelor: ≤ 2 mm, însă > 50 % din particule trebuie să se încadreze în intervalul 50 – 200 µm	76
Argilă de caolinit	Conținut de caolinit ≥ 30 %	22 ± 1
Sursa de hrană	*Folia urticae*, frunze granulate de *Urtica sp.* (urzică iritantă), fin măcinată (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm) sau un amestec de frunze granulate de *Urtica sp.* cu alfa-celuloză (1: 1); în conformitate cu standardele farmaceutice, pentru consum uman; în plus față de sedimentul uscat	0,4 – 0,5 %
Carbonat de calciu	$CaCO_3$, pulverizat, pur din punct de vedere chimic, adăugat la sedimentul uscat	0,05 – 1
Apă deionizată	Conductivitate ≤ 10 µS/cm, adăugată la sedimentul uscat	30 – 50

În cazul în care se preconizează concentrații mari de amoniac, de exemplu, dacă se știe că substanța testate inhibă nitrificarea, ar putea fi utilă înlocuirea a 50 % din pudra de urzică bogată în azot cu celuloză (de exemplu, pudră de α-celuloză, pură din punct de vedere chimic, dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm).

Pregătire

Turba este uscată cu aer și măcinată ca pudră fină (dimensiunea particulelor ≤ 0,5 mm, fără reziduuri vizibile de plante). Se prepară o suspensie din cantitatea necesară de pudră de turbă cu ajutorul unei părți de apă deionizată care trebuie adăugată la sedimentul uscat [un volum de apă de 11,5 × greutate umedă a turbei s-a considerat a fi util pentru a realiza o suspensie de turbă agitabilă (8)] utilizând un dispozitiv de omogenizare de înaltă performanță.

pH-ul acestei suspensii este ajustat la 5,5 ± 0,5 cu $CaCO_3$. Suspensia este condiționată timp de cel puțin două zile, agitându-se ușor la 20 ± 2 °C, pentru stabilizarea pH-ului și stabilirea unei componente microbiene stabile. Se măsoară din nou pH-ul și se ajustează în intervalul 6 ± 0,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Apoi întreaga suspensie se amestecă cu ceilalți constituenți uscați, ținând cont de orice porție utilizată pentru adiționare. Se adaugă apa deionizată rămasă pentru a obține un sediment omogen. Se măsoară din nou pH-ul și se ajustează în intervalul 6,5 – 7,5 cu $CaCO_3$, dacă este necesar. Totuși, în cazul în care se preconizează o degajare de amoniac, poate fi utilă menținerea pH-ului sedimentului sub 7 (de exemplu între 6 și 6,5). Se prelevează eșantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul de carbon organic. În cazul în care se preconizează degajare de amoniac, sedimentul artificial poate să fie condiționat timp de șapte zile în aceleași condiții care predomină în testul ulterior (de exemplu, raport sediment-apă 1: 4, înălțimea stratului de sediment în vasele de testare) înainte de a fi adiționat cu substanța testată, adică necesită completare cu apă, care trebuie să fie aerată. La finalul perioadei de condiționare, apa acoperitoare trebuie extrasă și eliminată. Se prelevează eșantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și conținutul total de carbon organic (de exemplu, 3 eșantioane).

▼M6

Ulterior, nisipul de cuarț adiționat este amestecat cu sediment pentru fiecare nivel de tratament, sedimentul este distribuit în vasele replică de testare și acoperit cu apă de testare (de exemplu, raport sediment-apă 1: 4, înălțimea stratului de sediment în vasele de testare). Vasele sunt apoi incubate în aceleași condiții care prevalează în testul ulterior. În acest moment începe perioada de echilibrare. Apa de acoperire trebuie să fie aerată.

Sursa de hrană aleasă trebuie adăugată înainte sau pe parcursul adiționării sedimentului cu substanța testată. Ea poate fi amestecată în prealabil cu suspensia de turbă (a se vedea mai sus). Cu toate acestea, degradarea excesivă a sursei de hrană înainte de adăugarea organismelor de testare – de exemplu, în cazul unei perioade lungi de echilibrare – poate fi evitată prin scurtarea cât mai mult posibil a perioadei dintre momentul adăugării hranei și începutul expunerii. Pentru a asigura un contact suficient al hranei cu substanța testată, sursa de hrană trebuie amestecată cu sedimentul cel târziu în ziua adiționării substanței testate în sediment. Se pot face excepții în cazul în care durata perioadei de echilibrare conduce la degradarea microbiană excesivă a hranei înainte de adăugarea organismele de testare. Se prelevează eșantioane din sediment pentru a determina greutatea uscată și carbonul organic total (de exemplu, 3 eșantioane de sediment adiționat sau de control).

Greutatea uscată a constituenților (turbă, nisip, caolin) trebuie să fie raportată în g și în procente din substanța uscată totală.

Volumul de apă care trebuie adăugat la componentele uscate în timpul preparării sedimentului trebuie, de asemenea, raportat în procente din greutatea uscată totală (de exemplu, 100 % greutate uscată + 46 % apă înseamnă 1 000 g greutate uscată primesc un total de 460 ml de apă, care rezultată în 1 460 g de sediment umed).

Depozitare

Constituenții uscați ai sedimentului artificial pot fi depozitați într-un loc uscat și răcoros, la temperatura camerei. Sedimentul preparat umed poate fi depozitat (pentru utilizarea ulterioară numai în cultură) la 4 ± 2 °C, la întuneric, timp de 2 – 4 săptămâni de la ziua preparării (8).

Sedimentul adiționat cu substanța testată trebuie utilizat imediat, exceptând cazul în care există informații care indică faptul că acel sediment poate fi depozitat fără a fi afectate toxicitatea și biodisponibilitatea substanței testate. Eșantioanele de sediment adiționat pot fi depozitate până la analiză în condițiile recomandate pentru tipul respectiv de substanță testată.

▼M6

Apendicele 6

Speciile de oligochete recomandate pentru testarea bioacumulării

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Oligochetele tubificide (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) trăiesc în sedimente de apă dulce în conducte căptușite cu mucus. In aceste conducte, viermii stau cu capul în jos, ingerând particule de sedimente folosind microorganisme asociate și resturi organice. Partea posterioară de obicei se ondulează în apa acoperitoare în scopuri de respirare. Deși habitatul acestei specii este reprezentat de o mare varietate de tipuri de sedimente întâlnite în întreaga emisferă nordică, *Tubifex tubifex* preferă particulele de dimensiuni relativ mici (59). Caracterul adecvat al acestei specii pentru testarea ecotoxicologică este descrisă, de exemplu, în referințele (8) (29) (31) (39) (60)(62) (63).

Metode de cultură

Pentru a avea un număr suficient de exemplare de *Tubifex tubifex* pentru efectuarea testelor de bioacumulare, viermii trebuie păstrați în cultură de laborator permanentă. Pentru cultura *T. tubifex* se recomandă un sistem alcătuit din sediment artificial bazat pe sol artificial conform metodei de testare C.8 (40) și apă reconstituită conform metodei de testare C.1 (8).

Se pot utiliza ca vase de cultură și recipiente din sticlă sau din oțel inoxidabil cu înălțimea cuprinsă între 12 și 20 cm. Fiecare recipient de cultură este încărcat cu un strat de sediment artificial umed preparat astfel cum se descrie în apendicele 5. Adâncimea stratului de sediment trebuie să permită comportament natural de săpare de galerii al viermilor (adâncime minimă de 2 cm pentru *T. tubifex*). Apa reconstituită este adăugat la sistem. Trebuie procedat cu grijă pentru a minimiza perturbarea sedimentului. Întreaga cantitate de apă trebuie ușor aerată (de exemplu, 2 bule pe secundă cu aer filtrat prin sită de 0,45 μm) cu ajutorul unei pipete Pasteur așezată la aproximativ 2 cm deasupra suprafeței sedimentului. Temperatura recomandă pentru cultură este de 20 ± 2 °C.

Viermii se adăugă la sistemul de cultură în condițiile unei încărcături maxime de 20 000 de indivizi/m^2 de suprafață a sedimentului. O încărcare mai mare poate duce la o reducere a vitezei de creștere și de reproducere (43).

In culturile de sediment artificial, viermii trebuie să fie hrăniți. Un regim de hrănire constând din hrană de pești măcinată fin, de exemplu TetraMin® poate servi ca nutriție suplimentară (8); Klerks 1994, comunicare personală. Intervalele de hrănire trebuie să permită creștere și reproducere suficiente și trebuie să mențină la un nivel minim acumularea de amoniac și dezvoltarea de ciuperci în cultură. Hrana trebuie administrată de două ori pe zi (de exemplu, 0,6 – 0,8 mg per cm^2 de suprafață a sedimentului). Experiența practică a demonstrat că aplicarea de hrană suspendată și omogenizată în apă deionizată poate facilita distribuirea omogenă hranei pe suprafața sedimentului în recipientele de cultură

Pentru a evita orice fel de acumulare de amoniac, apa acoperitoare trebuie schimbată utilizând un sistem cu flux continuu sau, cel puțin o dată pe săptămână, manual. Sedimentul trebuie schimbat la fiecare trei luni în culturile stoc.

Prelevarea de viermi din cultură se poate face prin cernerea sedimentului de cultură printr-o sită de 1 mm în cazul în care sunt necesari doar adulții. Pentru reținerea coconilor e necesară o sită de 0,5 mm, iar pentru viermii tineri, una de 0,25 mm. Sitele pot fi introduse în apă reconstituită după ce sedimentul a fost cernut. Viermii părăsesc sita și pot fi apoi preluați din apă folosind un forceps fin din oțel sau o pipetă cu margini finisate la foc.

▼M6

Numai exemplarele intacte și clar identificate de *Tubifex tubifex* [de exemplu (64)] sunt utilizate pentru a începe un test sau noi culturi. Viermii bolnavi sau lezați, precum și coconii infestați cu hife fungice trebuie eliminați.

O cultură sincronizată poate furniza viermi de o anumită vârstă la intervale adecvate, atunci când se dorește. Noi vase de cultură sunt pregătite la intervalele alese (de exemplu, la fiecare două săptămâni), începând cu animale de o anumită vârstă (de exemplu, coconi). La condițiile de cultură descrise aici, viermii devin adulți după 8 – 10 săptămâni. Culturile pot fi recoltate, în cazul în care viermii au depus noi coconi, de exemplu, după zece săptămâni. Adulții prelevați pot fi utilizați în teste, iar cu coconii se pot iniția noi culturi.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) este, de asemenea, un locuitor al sedimentelor de apă dulce în întreaga lume și este utilizat pe scară largă în testarea ecotoxicologică. Informații cu privire la biologia, condițiile de cultură și la sensibilitatea speciei pot fi obținute din (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* poate fi, de asemenea, cultivat în sedimentul artificial recomandate pentru *T. tubifex* în conformitate cu (8), în anumite limite. Întrucât, în natură, *L. variegatus* preferă sedimente mai aspre decât *T. tubifex* (59), culturile în laborator cu sediment artificial folosit pentru *T. tubifex* pot înceta după 4 – 6 luni. Experiența practică a demonstrat că *L. variegatus* poate fi ținut într-un substrat nisipos (de exemplu, nisip de cuarț, pietriș fin) într-un sistem cu flux continuu utilizând peștele ca sursă de hrană de-a lungul mai multor ani fără a reînnoi substratul. Un avantaj major al *L. variegatus* față de alte specii de oligochete acvatice este reproducerea rapidă, rezultând o biomasă rapid crescătoare în populații cultivate în laborator (1)(6)(9)(10).

Metode de cultură

Condițiile cultivării *Lumbriculus variegatus* sunt schițate în detaliu în Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Un rezumat al acestor condiții este prezentat în continuare.

Viermii pot fi cultivați în acvarii de mari dimensiuni (57 – 80 l) la o temperatură de 23 °C cu o perioadă de expunere de 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric (100 – 1 000 lux) utilizând apă naturală reînnoită zilnic (45 – 50 l per acvariu). Substratul este preparat prin decuparea de fâșii din șervete de hârtie maro nealbită care apoi pot fi amestecate cu apa de cultură timp de câteva secunde pentru a obține mici bucăți de substrat de hârtie. Acest substrat poate fi apoi utilizat direct în acvariul de cultură a *Lumbriculus* prin acoperirea fundului bazinului sau poate fi depozitat congelat în apă deionizată în vederea unei utilizări ulterioare. Noul substrat din bazin va dura în general aproximativ două luni.

Fiecare cultură de viermi începe cu 500 – 1 000 de viermi care sunt hrăniți cu o suspensie de 10 ml conținând 6 g de hrană de pornire pentru păstrăvi de 3 ori pe săptămână, în condiții de reînnoire sau cu flux continuu. În cazul culturilor statice sau semistatice, vitezele de hrănire trebuie reduse pentru a preveni dezvoltarea de bacterii și de ciuperci. Hrana și substratul de hârtie trebuie analizat din punctul de vedere al substanțelor care trebuie folosite în testele de bioacumulare.

În aceste condiții, numărul de exemplare din cultură se dublează în general în aproximativ 10 – 14 zile.

Lumbriculus variegatus poate fi extras din culturi, de exemplu, prin transferul substratului într-un pahar de laborator separat cu ajutorul unei plase fine sau al organismelor cu ajutorul unei pipete din sticlă cu gura largă (cu diametrul de aproximativ 5 mm) finisată la foc. În cazul în care substratul este cotransferat în respectivul pahar de laborator, paharul conținând viermi și substrat este lăsat

▼M6

peste noapte în condiții de flux continuu, care vor elimina substratul din pahar, viermii rămânând pe fundul vasului. Aceștia pot fi apoi introduși în bazine de cultură nou pregătite sau prelucrați ulterior pentru test conform descrierii din referințele (1) și (6). A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor pensete din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

Atunci când se utilizează *L. variegatus* în testele de bioacumulare în sediment trebuie acordată atenție modului său de reproducere (fragmentare urmată de regenerare). Acest mod de reproducere asexuată are ca rezultat două fragmente, care nu se hrănesc o anumită perioadă până ce segmentul capului sau al cozii se regenerează [de exemplu, (36), (37)]. Aceasta înseamnă că este posibil ca în cazul *L. variegatus* absorbția de sediment și de contaminanți să nu se realizeze continuu ca în cazul tubificidelor, care nu se reproduc prin fragmentare.

Prin urmare, trebuie realizată o sincronizare pentru reducerea la minimum a reproducerii și a regenerării necontrolate care determină o variație mare a rezultatelor testului. O astfel de variație poate apărea atunci când unele exemplare, care sunt fragmentate și care, în consecință, nu se hrănesc într-o anumită perioadă, sunt expuse mai puțin la substanța testată decât alte exemplare care nu se fragmentează pe parcursul testului, de exemplu (38). Cu 10 – 14 zile înainte de expunere, viermii trebuie să fie fragmentați în mod artificial (sincronizare) (65). Trebuie utilizați viermi mari, care, de preferință, nu prezintă semne de fragmentare recentă. Acești viermi pot fi așezați pe o lamă din sticlă într-o picătură de apă de cultură și disecați cu ajutorul unui bisturiu în regiunea mediană a corpului. Trebuie avut grijă ca extremitățile posterioare să fie de dimensiuni similare. Extremitățile posterioare trebuie apoi lăsate să regenereze capete noi într-un vas de cultură care să conțină același substrat ca cel utilizat în cultură și apă reconstituită, până la începerea perioadei de expunere. Regenerarea de capete noi este indicată în momentul în care viermii sincronizați sapă galerii în substrat (prezența capetelor regenerate poate fi confirmată prin examinarea la un microscop binocular a unui subeșantion reprezentativ). Se preconizează că, ulterior, organismele de testare se află într-o stare fiziologică similară. Aceasta înseamnă că, atunci când are loc regenerarea în cazul viermilor sincronizați pe parcursul testului, se estimează că practic toate animalele sunt expuse în aceeași măsură la sedimentul adiționat. Hrănirea viermilor sincronizați trebuie să se realizeze imediat ce viermii încep să sape galerii în substrat sau după 7 zile de la disecție. Regimul de hrănire trebuie să fie comparabil cu cel al culturilor normale, însă se recomandă hrănirea viermilor sincronizați cu aceeași sursă de hrană ca cea utilizată în cadrul testului. Viermii trebuie ținuți la o temperatură de testare, la 20 ± 2 °C. După regenerare, trebuie utilizați pentru test viermii de dimensiune similară, întregi și intacți care înoată sau se târăsc activ după aplicarea unui stimul mecanic ușor. A se evita rănirea sau autotomia viermilor, de exemplu, prin utilizarea pipetelor cu margini finisate la foc sau a unor pensete din oțel inoxidabil pentru manipularea respectivilor viermi.

Când se utilizează *Lumbriculus variegatus* pentru testare, din cauza modului specific de reproducere a acestei specii, o creștere a numărului de viermi trebuie să apară în timpul testului, dacă condițiile sunt corespunzătoare (6). Lipsa reproducerii în cadrul unui test de bioacumulare cu *L. variegatus* trebuie înregistrată și trebuie luată în considerare la interpretarea rezultatelor testelor.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificide, Oligochete (nevalidate în teste interlaboratoare)**

Branchiura sowerbyi locuiește într-o varietate de tipuri de sedimente din bazine, lacuri, iazuri și râuri, fiind originară din zonele tropicale. De asemenea, ea poate fi întâlnită și în acumulările de apă caldă din emisfera nordică. Cu toate acestea, ea este mai abundentă în sedimentele cu mâl argilos, cu un conținut mare de

▼M6

materie organică. În plus, viermii trăiesc în stratul de sedimente. Chiar și partea posterioară a viermilor este de obicei pătrunsă în galerie. Această specie este ușor de identificat prin filamentele branhiale din partea lor posterioară. Adulții pot ajunge la o lungime de 9 – 11 cm și la o greutate umedă de 40 – 50 mg. Adulții au o rată mare de reproducere, populația dublându-se în mai puțin de 2 săptămâni, în condițiile de temperatură și de hrănire descrise mai jos [Aston et al., 1982, (65)]. *B. sowerbyi* a fost folosită în studiile de toxicitate și de bioacumulare [Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, respectiv (67)].

Metode de cultură

Un rezumat al condițiilor de cultură pentru *Branchiura sowerbyi* este oferit mai jos (pus la dispoziție de Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina și Carla J. Roghair, RIVM, Țările de Jos).

Nu este necesară o singură tehnică pentru cultivarea organismelor de testare. Organismele pot fi cultivate folosind sediment natural necontaminat (31). Experiența practică a demonstrat că un mediu alcătuit din sediment natural si nisip îmbunătățește starea viermilor în raport cu sedimentul pur natural (32) (67). pahare de laborator de 3 l care conține 1 500 ml de sediment/apă, constând în 375 ml de sediment natural necontaminat (aproximativ 10 % carbon organic total; aproximativ 17 % dintre particule ≤ 63 μm), 375 ml nisip curat (M32) și 750 ml de apă de la robinet reconstituită sau declorurată pot fi utilizate pentru cultură (31) (32) (67). De asemenea, pot fi utilizate prosoape de hârtie ca substrat pentru cultură, însă creșterea populației este mai mică decât în sedimentele naturale. În sistemele semistatice, stratul de apă în paharul de laborator este aerat ușor, iar apa acoperitoare trebuie reînnoită săptămânal.

Fiecare pahar conține la început 25 de viermi tineri. După două luni, viermii mari sunt colectați din sediment cu ajutorul unei pensete și sunt introduși într-un nou pahar cu mediu sediment/apă proaspăt preparat. Paharul vechi conține, de asemenea, coconi și viermi tineri. Până la 400 de viermi tineri per pahar pot fi recoltați în acest mod. Viermii adulți pot fi folosiți pentru reproducere timp de cel puțin un an.

Culturile trebuie menținute la o temperatură de 21 până la 25 °C. Variația temperaturii trebuie menținută sub ± 2 °C. Perioada necesară pentru dezvoltarea embrionară din ouăle care sunt depuse până când exemplarele tinere părăsesc coconul este de aproximativ trei săptămâni la 25 °C. Producția de ouă obținută per vierme supraviețuitor în cazul *B. sowerbyi* s-a constatat că este între 6,36 (31) și 11,2 (30) în nămol la 25 °C. Numărul de ouă per cocon variază de la 1,8 la 2,8 (66) (69) sau până la 8 (68).

Oxigenul dizolvat, duritatea apei, temperatura și pH-ul trebuie măsurate săptămânal. Hrana pentru pești (de exemplu, TetraMin®) poate fi adăugată sub formă de suspensie de două sau de trei ori pe săptămână *ad libitum*. Viermii pot fi hrăniți și cu salată verde decongelată *ad libitum*.

Un avantaj major al acestei specii este biomasa individuală mare (până la 40 – 50 mg greutate umedă per individ). Prin urmare, această specie poate fi utilizată pentru testarea bioacumulării substanțelor testate nemarcate radioactiv. Poate fi expusă în sistemele utilizate pentru *T. tubifex* sau *L. variegatus* cu un singur individ per replică (11). Totuși, numărul de replici trebuie mărit, cu excepția situației în care sunt folosite camere de testare mai mari (11). De asemenea, criteriul de validitate pentru comportamentul de săpare de galerii trebuie ajustat pentru această specie.

▼**M6**

BIBLIOGRAFIE

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I – IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(5) Chapter C.13 of this Annex, Bioconcentration Flow Thorough Fish test.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Chapter C.27 of this Annex, Sediment water Chironomid toxicity test using spliked sediment

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) The following chapters of this Annex:

Chapter A.4, vapour pressure

Chapter A.5, Surface tension

Chapter A.6, Water solubility

Chapter A.8, Partition coefficient, shake flask method

Chapter A.24, Partition coefficient, HPLC method

Chapter C.7, degradation — abiotic degradation: hydrolysis as a function of pH

Chapter C.4 A-F Determination of ready biodegradability

Chapter C.19, Estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) on soil and on sewage sludge using high performance liquid chromatography (HPLC)

Chapter C.29, Ready biodegradability CO_2 in sealed vessels

(23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061-1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155-160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163-168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Chapter C.1 of this Annex, Fish, Acute Toxicity Test.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼M6

(40) Chapter C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267-274.

▼M7

C.47. PEȘTI, TEST DE TOXICITATE ÎN STADII TIMPURII DE VIAȚĂ

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea privind testarea (TG) nr. 210 a OCDE (2013). Testele cu pești în stadii timpurii de viață sunt concepute să definească efectele letale și subletale ale substanțelor chimice asupra stadiilor și speciilor testate. Acestea oferă informații utile pentru estimarea efectelor cronice letale și subletale ale substanțelor chimice asupra altor specii de pești.

2. Orientarea privind testarea nr. 210 se bazează pe o propunere formulată de Regatul Unit, care a fost discutată în cadrul unei reuniuni a experților OCDE convocată la Medmenham (Regatul Unit) în noiembrie 1988 și a fost actualizată în 2013 pentru a reflecta experiența acumulată în utilizarea testului și recomandările formulate în urma unui atelier de lucru al OCDE privind testarea toxicității la pești, desfășurat în septembrie 2010 (1).

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Peștii aflați în stadii timpurii de viață sunt expuși la o serie de concentrații ale substanței de testat dizolvată în apă. Sunt preferate condiții de testare dinamică; cu toate acestea, dacă nu este posibil, sunt acceptate, de asemenea, condiții de testare semistatică. Pentru detalii suplimentare, a se consulta documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (2). Testul începe prin așezarea ouălor fertilizate în camere de testare și continuă pentru perioada de timp specifică fiecărei specii necesară pentru ca peștii de control să ajungă în stadiul de alevini. Efectele letale și subletale sunt evaluate și comparate cu valorile probelor de control pentru a determina concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) în vederea stabilirii (i) concentrației la care nu se observă niciun efect (NOEC) și/sau (ii) EC_x (de ex. EC_{10}, EC_{20}) prin folosirea unui model de regresie în vederea estimării concentrației care ar determina o modificare de x % a efectului măsurat. Raportarea concentrațiilor de efect și a parametrilor relevanți poate depinde de cadrul de reglementare. Concentrațiile de testare trebuie să încadreze EC_x astfel încât EC_x să provină mai degrabă din interpolare decât din extrapolare (a se vedea apendicele 1 pentru definiții).

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA DE TESTARE

4. Substanța de testare se referă la ceea ce este testat. Este necesară cunoașterea solubilității în apă (a se vedea capitolul A.6 din prezenta anexă) și a presiunii vaporilor substanței de testare (a se vedea capitolul A.4 din prezenta anexă). Trebuie să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței din soluțiile de testat cu o precizie cunoscută și validată și cu o limită de cuantificare. Deși acestea nu sunt necesare pentru efectuarea testului, rezultatele unui test de toxicitate acută (a se vedea capitolele C.1 sau C.49 din prezenta anexă), de preferință efectuat cu speciile alese pentru testul de față, pot furniza informații utile.

5. În cazul în care metoda de testare este utilizată pentru testarea unui amestec, compoziția acestuia trebuie să fie caracterizată pe cât posibil, de exemplu de identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile specifice substanței (precum cele menționate mai sus). Înainte de a folosi această metodă de testare în scopul reglementării unui amestec, trebuie să se ia în considerare dacă aceasta va avea rezultate acceptabile în acest scop.

6. Informațiile utile includ formula structurală, gradul de puritate al substanței, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a, P_{ow} și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă (de exemplu, capitolele C.4 sau C.29 din prezenta anexă).

▼M7

VALIDITATEA TESTULUI

7. Pentru ca un test să fie valid, trebuie să se aplice următoarele condiții:

— concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe parcursul întregii perioade de expunere mai mare de 60 % din valoarea de saturație din aer;

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între camerele de testare sau în zile succesive în niciun moment pe parcursul testului și trebuie să fie menținută în intervalele de temperatură specificate pentru specia de testare (apendicele 2);

— măsurarea analitică a concentrațiilor de testare este obligatorie;

— rata generală de supraviețuire a ouălor fertilizate și de reușită după eclozare la probele de control și, atunci când este cazul, la probele de control cu solvenți trebuie să fie mai mare sau egală cu limitele definite în apendicele 2.

8. Dacă se observă o abatere minoră de la criteriul de validitate, consecințele trebuie luate în considerare în relație cu fiabilitatea datelor testului, iar aceste considerații trebuie incluse în raport. Efectele asupra supraviețuirii, eclozării sau creșterii care apar la controlul cu solvent, prin comparație cu controlul negativ, trebuie raportate și discutate în contextul fiabilității datelor testului.

DESCRIEREA METODEI

Camere de testare

9. Se poate utiliza orice tip de vas din sticlă, oțel inoxidabil sau alt material inert din punct de vedere chimic. Întrucât este cunoscut faptul că siliconul are o capacitate crescută de a absorbi substanțe liofile, trebuie minimizată utilizarea tuburilor de silicon în cadrul studiilor dinamice și a garniturilor de silicon în contact cu apa, prin folosirea, de exemplu, a acvariilor din sticlă de tip monobloc. Dimensiunile vaselor trebuie să fie suficient de mari pentru a permite creșterea corespunzătoare a controlului, menținerea concentrației oxigenului dizolvat (de exemplu, pentru speciile de pești mici este suficient un bazin cu un volum de 7 litri) și respectarea ratei de încărcare indicate la punctul 19. Se recomandă poziționarea aleatorie a camerelor de testare în zona de testare. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor cu fiecare concentrație prezentă în fiecare bloc este de preferat unui protocol complet aleatoriu. Camerele de testare trebuie protejate împotriva oricărei perturbări nedorite. Sistemul de testare trebuie, de preferință, să fie condiționat cu concentrații ale substanței de testare pe o perioadă de timp suficientă pentru a demonstra stabilitatea concentrațiilor de expunere înainte de introducerea organismelor de testare.

Alegerea speciei

10. Tabelul 1 conține o listă cu specii de pește recomandate. Aceasta nu exclude folosirea altor specii, dar poate fi necesar ca procedura de testare să fie adaptată pentru a oferi condiții corespunzătoare de testare. În acest caz, argumentația care stă la baza alegerii speciei și a metodei de testare trebuie specificată în raport.

Îngrijirea peștilor reproducători

11. Detalii despre îngrijirea populației de pești reproducători în condiții satisfăcătoare se regăsesc în apendicele 3 și în referințele citate (3) (4) (5).

Manipularea ouălor fertilizate, a embrionilor și a larvelor

12. Inițial, ouăle fertilizate, embrionii și larvele pot fi expuse în interiorul vasului principal, în vase mai mici din sticlă sau oțel inoxidabil, prevăzute cu plase

▼M7

laterale sau la capete pentru a permite fluxul substanței chimice testate în cameră. Curgerea neturbulentă prin aceste camere de mici dimensiuni poate fi indusă prin suspendarea lor de un braț mobil, care le deplasează în sus și în jos, dar astfel încât să mențină organismele imersate. Ouăle fertilizate de salmonide pot fi puse pe stative sau plase cu deschiderile suficient de mari pentru a permite larvelor să traverseze după eclozare.

13. În cazul în care au fost folosite recipiente, grile sau plase pentru a păstra ouăle în vasul principal de testare, acestea trebuie îndepărtate după eclozarea larvelor, conform orientărilor prezentate în apendicele 3, cu excepția plaselor care sunt păstrate pentru a împiedica larvele să scape. Dacă este necesar să se transfere larvele, acestea nu trebuie expuse la aer, iar plasele nu trebuie utilizate pentru a elibera larvele din recipientele pentru ouă. Momentul transferului variază în funcție de specie și trebuie să fie documentat în raport. Cu toate acestea, transferul nu este întotdeauna necesar.

Apa

14. Orice apă în care specia de testare prezintă o supraviețuire și o creștere pe termen lung corespunzătoare este adecvată ca apă de testare (a se vedea apendicele 4). Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Pentru ca apa de diluție să nu influențeze în mod nepermis rezultatele testelor (de exemplu, prin reacție cu substanța chimică de testare) sau să afecteze negativ comportamentul peștilor reproducători, trebuie prelevate periodic eșantioane pentru probă. Acolo unde se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, trebuie să se măsoare, de exemplu bianual, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), amoniu, pesticide cu clor rezidual total, carbon organic total și solide în suspensie. Dacă se știe că apa are o calitate variabilă, măsurătorile trebuie efectuate mai des; frecvența depinde de cât de variabilă este calitatea acesteia. Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 4.

Soluții de testare

15. Pentru testele în regim de flux continuu, este necesar un sistem care să dozeze și să dilueze continuu soluția stoc a substanței de testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem saturator) pentru a furniza o serie de concentrații în camerele de testare. Debitele soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic pe durata testului și nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe durata întregului test. Un debit echivalent cu cel puțin de cinci ori volumul unei camere în 24 de ore este considerat adecvat (3). Cu toate acestea, dacă se respectă rata de încărcare specificată la punctul 19, un debit mai mic, de exemplu de 2-3 volume de cameră, poate preveni îndepărtarea rapidă a hranei.

16. Soluțiile de testare ale concentrațiilor alese se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței de testare în apa de diluție, folosind mijloace mecanice (de exemplu, cu un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate) sau metode de dozare pasivă (6). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație precum cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente; astfel, nivelul solventului ar trebui să fie de preferință egal în toate concentrațiile, precum și în vasul de control cu solvent. Pentru unele sisteme de diluție dificile din punct de vedere tehnic, concentrația solventului în vasul de control cu solvent trebuie să fie egală cu concentrație cea mai mare de solvent din grupul supus tratamentului. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (2). În cazul în care

▼M7

se utilizează un anumit solvent, alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței. Documentul de orientare al OCDE nr. 23 recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100µl/l. Pentru a evita eventuale efecte ale solventului asupra parametrilor măsurați (7), se recomandă menținerea concentrației solventului cât mai scăzută posibil.

17. Pentru efectuarea unui test în regim semistatic, pot fi urmate două proceduri diferite de reînnoire. Fie se prepară soluții noi de testare în recipiente curate, iar ouăle și larvele supraviețuitoare sunt transferate cu grijă în noile vase, fie organismele testate sunt păstrate în vasele de testare, în timp ce o proporție (cel puțin două treimi) din volumul soluției de testare / de control este schimbată.

MOD DE OPERARE

Condiții de expunere

Durată

18. Testul trebuie să înceapă imediat ce ouăle au fost fertilizate și de preferință imersate în soluțiile de testare înainte de începerea fazei de divizare a discului embrionar sau cât se poate de repede după încheierea acestei etape. Durata de testare depinde de specia folosită. Câteva durate recomandate sunt prezentate în apendicele 2.

Încărcarea

19. Numărul de ouă fertilizate la începutul testului trebuie să fie suficient pentru a îndeplini condițiile statistice. Acestea trebuie distribuite în mod aleatoriu în vasele supuse tratamentului și se vor folosi cel puțin 80 de ouă, împărțite în mod egal între puțin patru camere de testare duplicate pentru fiecare concentrație. Rata de încărcare (biomasă per volum de soluție testată) trebuie să fie suficient de scăzută astfel încât o concentrație a oxigenului dizolvat de minimum 60 % din valoarea de saturație din aer să poată fi menținută fără aerare pentru stadiile de ou și larvă. Pentru testele în regim de flux continuu, se recomandă o rată de încărcare care să nu depășească 0,5 g/l greutate umedă pe parcursul a 24 de ore și 5 g/l de soluție în orice moment (3).

20.

Lumina și temperatura
Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (a se vedea apendicele 2).

Hrănirea

21. Hrana și hrănirea sunt critice și este esențială administrarea unei hrane corecte pentru fiecare etapă la intervale adecvate de timp și la un nivel suficient pentru a susține creșterea normală. Porțiile de hrană trebuie să fie aproximativ egale pentru toate probele duplicat, cu excepția cazului în care au fost adaptate pentru a justifica mortalitatea. Excedentul de hrană și fecale trebuie înlăturat dacă este cazul, pentru a evita acumularea de deșeuri. Regimuri detaliate de hrană sunt prezentate în apendicele 3, însă, pe măsură ce se acumulează experiență, hrana și regimul de hrănire sunt perfecționate permanent pentru a îmbunătăți rata de supraviețuire și pentru a optimiza creșterea. Hrana vie oferă o sursă de îmbogățire a mediului de viață și, prin urmare, trebuie să fie utilizată în loc de sau în plus față de alimentele congelate sau uscate ori de câte ori acest lucru este necesar în funcție de specie și de stadiul de viață.

Concentrațiile de testare

22. În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței de testare, cu un minimum de patru probe duplicat pentru fiecare concentrație, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește 3,2. Atunci când se alege intervalul concentrațiilor de testare, dacă sunt disponibile, se vor lua în considerare informații privind testarea toxicității acute, preferabil cu aceeași specie și/sau test de stabilire a intervalului. Cu toate acestea, trebuie avute în vedere toate sursele de informare atunci când se stabilește intervalul concentrațiilor de testare, inclusiv surse precum, prin extrapolare, datele testului de toxicitate acută pe embrioni de pește. Un test la valori-limită sau un test la valori-limită extins, cu mai puțin de cinci concen-

▼M7

trații
poate fi acceptabil ca test definitiv atunci când trebuie stabilite numai valorile empirice ale NOEC. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se va oferi o justificare pentru această alegere. Nu este necesară testarea concentrațiilor substanțelor chimice mai mari de LC_{50} la 96 de ore sau 10 mg/l, oricare este mai scăzută dintre acestea.

Controale

23. Pe lângă seria de concentrații ale substanței de testare, se va testa o probă de control cu apă de diluție și, dacă este necesar, o probă de control cu solvent care conține solventul purtător (a se vedea punctul 16).

Frecvența determinărilor și a măsurătorilor analitice

24. Înainte de începerea perioadei de expunere, se va asigura funcționarea corectă a sistemului de alimentare cu substanța chimică pentru toate probele duplicat (de exemplu, prin măsurarea concentrațiilor de testare). Metodele analitice necesare trebuie să fie stabilite, inclusiv limita adecvată de cuantificare (LOQ) și cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței în sistemul de testare. Pe durata testului, concentrațiile substanței de testare sunt determinate la intervale regulate în vederea caracterizării expunerii. Sunt necesare cel puțin cinci determinări. În cadrul sistemelor în regim dinamic, se vor face măsurători analitice ale substanței de testare într-o probă duplicat pentru fiecare concentrație cel puțin o dată pe săptămână schimbând probele duplicat în mod sistematic. Determinări analitice suplimentare vor îmbunătăți calitatea rezultatului testului. Se poate dovedi necesară filtrarea probelor pentru a îndepărta particulele în suspensie (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugarea astfel încât determinările să fie realizate pe substanță în soluție reală. Pentru a reduce absorbția substanței de testare, este necesară saturarea filtrelor înainte de utilizare. Atunci când concentrațiile măsurate depășesc intervalul de 80-120 % din concentrația nominală, concentrațiile de efect trebuie determinate și exprimate în raport cu media aritmetică a concentrației pentru testele în flux continuu (a se vedea apendicele 6 din metoda de testare C.20 pentru calculul mediei aritmetice (8)) și exprimată în raport cu media geometrică a concentrațiilor măsurate pentru testele semistatice (a se vedea capitolul 5 din documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (2)).

25. În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână, iar salinitatea și duritatea, în cazul în care acest lucru se justifică, la începutul și la sfârșitul testului. Este preferabil ca temperatura să fie monitorizată continuu în cel puțin un vas de testare.

Observații

26. **Stadiul dezvoltării embrionare**: stadiul embrionar la începutul expunerii la substanța de testare trebuie verificat cât mai exact posibil. Aceasta se poate realiza folosind un eșantion reprezentativ de ouă păstrate corespunzător și curățate.

27. **Eclozarea și supraviețuirea**: Observațiile referitoare la eclozare și supraviețuire trebuie să efectuate cel puțin o dată pe zi, iar numărul ouălor eclozate și al supraviețuitorilor trebuie înregistrat. Dacă se observă pe ouă prezența de fungi la debutul dezvoltării embrionare (de exemplu, în prima sau a doua zi a testului), ouăle respective trebuie numărate și îndepărtate. Exemplarele moarte de embrioni, larve și pești tineri trebuie îndepărtate imediat după ce au fost observate, întrucât se pot descompune rapid și pot fi dezintegrate prin acțiunile altor pești. La îndepărtarea exemplarelor moarte trebuie să se manifeste o grijă extremă pentru a nu lovi sau leza fizic ouăle/larvele din vecinătate. Simptomele care indică moartea variază în funcție de specie și de stadiul de viață. De exemplu:

▼M7

— pentru ouăle fertilizate: în special în stadiile timpurii, o pierdere accentuată a translucidității și schimbarea colorației, provocată de coagularea și/sau precipitarea proteinelor, conducând la un aspect alb-opac;

— pentru embrioni, larve și exemplarele tinere de pești: imobilitatea și/sau absența mișcărilor respiratorii și/sau lipsa de reacție la stimuli mecanici.

28. **Aspectul anormal**: numărul de larve sau exemplare tinere de pești care prezintă anomalii legate de forma corpului trebuie înregistrat la intervale adecvate, în funcție de durata testului și de natura anomaliei în cauză. Trebuie remarcat faptul că exemplarele tinere și larvele anormale apar în mod natural, iar numărul lor poate reprezenta câteva procente în loturile de control ale unor specii. Atunci când anomaliile și comportamentul anormal asociat sunt considerate atât de severe încât produc o suferință majoră organismului și s-a ajuns la un punct dincolo de care nu se poate recupera, acesta poate fi scos din test. Animalele respective trebuie eutanasiate și considerate mortalități pentru analiza ulterioară a datelor. Dezvoltarea embrionară normală a fost documentată pentru cele mai multe specii recomandate în această metodă de testare (9) (10) (11) (12).

29. **Comportamentul anormal**: anomaliile, de exemplu hiperventilarea, înotul necoordonat, imobilitatea neobișnuită și un mod de hrănire atipic trebuie înregistrate la intervale adecvate, în funcție de durata testului (de exemplu o dată pe zi pentru speciile de apă caldă). Aceste efecte, deși greu de cuantificat, pot contribui, atunci când sunt ținute sub observație, la interpretarea datelor privind mortalitatea.

30. **Greutate**: la sfârșitul testului, toți peștii supraviețuitori sunt cântăriți cel puțin pe bază de duplicat (se raportează numărul animalelor din proba duplicat și media greutății pentru fiecare animal): este preferată greutatea umedă – (zvântați), dar se poate raporta, de asemenea, greutatea uscată (13).

31. **Lungime**: la sfârșitul testului, se măsoară lungimile individuale. Se recomandă lungimea totală, însă dacă se constată o putrefacție sau o rosătură la înotătoarea caudală, se folosește lungimea standard. Trebuie folosită aceeași metodă pentru toții peștii dintr-un test dat. Lungimea individuală poate fi măsurată folosind, de exemplu, șublere, o cameră foto digitală sau un micrometru ocular calibrat. Lungimile minime tipice sunt definite în apendicele 2.

DATE ȘI RAPORTARE

Tratamentul rezultatelor

32. Se recomandă ca proiectarea testului și alegerea testului statistic să permită o putere adecvată (cel puțin 80 %) de a detecta schimbări cu importanță biologică ale punctelor finale în cazul în care urmează să fie raportată o NOEC. Este posibil ca raportarea unor concentrații de efect și a unor parametri relevanți să depindă de un cadru de reglementare. În cazul în care trebuie raportată o EC_x, proiectarea testului și selectarea modelului de regresie trebuie să permită estimarea EC_x astfel încât (i) intervalul de încredere de 95 % raportat pentru EC_x să nu conțină zero și să nu fie excesiv de mare, (ii) intervalul de încredere de 95 % pentru media preconizată a EC_x să nu conțină media probelor de control, (iii) să nu existe o neconcordanță semnificativă a modelului de regresie cu datele. Fiecare abordare impune identificarea schimbării procentuale la fiecare punct final care trebuie identificat sau estimat. Proiectarea testului trebuie adaptată pentru a permite acest lucru. Atunci când condițiile de mai sus necesare pentru determinarea EC_x nu sunt îndeplinite, se va folosi abordarea NOEC. Este posibil să nu se aplice aceeași schimbare procentuală pentru toate punctele finale și să nu poată fi conceput un test fezabil care să îndeplinească aceste criterii pentru toate punctele finale. Prin urmare, este

▼M7

important ca atenția să se concentreze asupra punctelor finale pentru testul respectiv în vederea unei proiectări adecvate a testului. Diagramele statistice de flux și indicațiile pentru fiecare abordare sunt prezentate în apendicele 5 și 6 pentru interpretarea datelor și alegerea celui mai potrivit test sau model statistic. Alte abordări statistice pot fi utilizate, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

33. Este necesar ca variațiile să fie analizate în cadrul fiecărui set de probe duplicat folosind analiza de varianță sau procedurile tabelelor de contingență, precum și metode adecvate de analiză statistică pe baza acestei analize. Pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și rezultatele obținute pentru loturile de control, se recomandă testul regresiv Jonckheere-Terpstra sau Williams pentru răspunsuri continue și un test regresiv Cochran-Armitage pentru răspunsuri cantitative în concordanță cu relația monotonă concentrație-răspuns și cu lipsa dovezii varianței extra-binomiale (14). Atunci când nu se înregistrează nicio varianță extra-binomială, se recomandă modificarea Rao-Scott a testului Cochran-Armitage (15) (16) sau testele Williams/Dunnett (după transformarea trigonometrică) sau un test Jonckheere-Terpstra aplicat proporțiilor probelor duplicat. Acolo unde datele nu corespund relației monotone concentrație-răspuns, se pot utiliza metodele Dunnett, Dunn sau Man-Whitney pentru un răspuns continuu și textul exact al lui Fisher pentru răspunsuri cantitative (14) (17) (18). Atunci când se aplică o metodă sau un model statistic, trebuie acordată atenție ca cerințele metodei sau ale modelului să fie îndeplinite (de exemplu, se estimează și se ia în calcul variabilitatea cameră la cameră în proiectarea testului și alegerea testului sau a modelului). Datele vor fi evaluate pentru normalitate, iar apendicele 5 indică modul în care trebuie procedat cu reziduurile provenite de la o analiză de varianță. Apendicele 6 prezintă considerații suplimentare pentru abordarea de regresie. Transformările pentru a îndeplini cerințele unui test statistic trebuie să fie luate în considerare. Cu toate acestea, transformările care permit ajustarea unui model de regresie necesită o atenție deosebită deoarece, de exemplu, o schimbare de 25 % în răspunsul netransformat nu corespunde unei schimbări de 25 % întrun răspuns transformat. În toate studiile, camera de testare și nu peștii individuali reprezintă unitatea de analiză și unitatea de testare, iar atât testele de regresie, cât și cele de ipoteză trebuie să reflecte aceste lucru (3) (14) (19) (20).

Raportul de testare

34. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța de testare:

Substanță mono-constituent

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților ca fiind adecvată și practic realizabilă etc. (inclusiv conținutul de carbon organic, dacă este cazul)

Substanță multi-constituent, UVCB și amestecuri:

— caracterizate pe cât posibil, de exemplu, de identitatea chimică (a se vedea mai sus), prezența cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților

Speciile de testare:

— numele științific, subspecia, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

▼M7

Condiții de testare:

— metoda de testare folosită (de exemplu, semistatică sau în regim dinamic, încărcarea);

— Perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— proiectarea testului (de exemplu, numărul de camere de testare și duplicate, numărul pe ouă per duplicat, materialul și mărimea camerei de testare (înălțime, lățime, volum), volumul apei pentru fiecare cameră de testare);

— metoda de preparare a soluțiilor stoc și frecvența reînnoirii (se specifică agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— metoda de dozare a substanței de testare (de exemplu, pompe, sisteme de diluare);

— eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorile măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testare în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă s-a făcut măsurarea), carbonul organic total (dacă s-a făcut măsurarea), solide în suspensie (dacă s-a făcut măsurarea), salinitatea mediului de testare (dacă s-a făcut măsurarea) și alte măsurători făcute;

— calitatea apei în vasele de testare, pH, duritate, temperatura și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații precise legate de alimentație (de exemplu, tipul de aliment(e), sursă, cantitatea administrată și frecvența).

Rezultate raportate individual (sau per duplicat) ca medie și coeficient de variație, după caz, pentru următoarele puncte finale:

— date care demonstrează că probele de control au îndeplinit standardul de supraviețuire globală acceptabil pentru specia testată (apendicele 2);

— date privind mortalitatea în fiecare stadiu (embrion, larvă și exemplare tinere) și mortalitatea cumulată;

— zilele de eclozare și numărul larvelor eclozate în fiecare zi, precum și sfârșitul eclozării;

— numărul de pești sănătoși la încheierea testului;

— date privind lungimea (se indică fie lungimea standard sau totală) și greutatea animalelor supraviețuitoare;

— incidența, descrierea și numărul anomaliilor morfologice, dacă există;

— incidența, descrierea și numărul efectelor comportamentale, dacă există;

— abordarea analizei statistice (analiza de regresie sau analiza de varianță) și prelucrarea datelor (testul statistic sau modelul utilizat);

— concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) pentru fiecare răspuns evaluat);

▼M7

— concentrația cea mai mică la care este observat un efect (la p=0,05) pentru fiecare răspuns evaluat (LOEC);

— EC_x pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (de exemplu 90 % sau 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați și erorile standard.

Orice abatere de la metoda de testare.

Discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență a abaterilor de la metoda de testare asupra rezultatelor testului.

Tabelul 1

Specii de pești recomandate pentru testare

Apă dulce	Specii marine și de estuar
Oncorhynchus mykiss Păstrăvi curcubeu	*Cyprinodon variegatus* Cyprinodon variegatus
Pimephales promelas Pimephales promelas	Menidia sp. Menidia sp.
Danio rerio Peștele-zebră	
Oryzias latipes Oryzias latipes	

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early LifeStage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 124188. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA660/375011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA600/377061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Capitolul C.20 din prezenta anexă, Test de reproducere pe *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for lifecycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 – 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 13731385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 10961121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

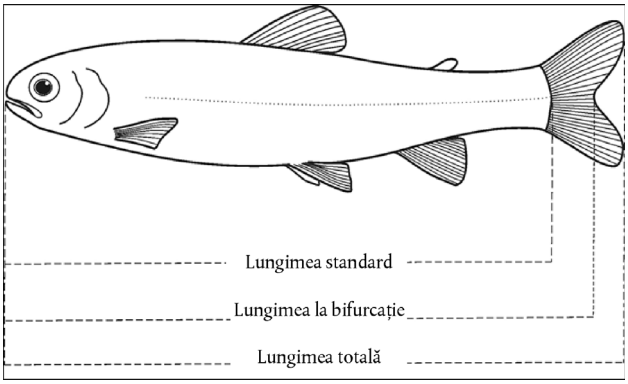
Lungimea cozii (LC)): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și capătul radiilor de mijloc ale înotătoarei caudale și este utilizată la peștii la care este dificil de precizat unde se termină coloana vertebrală (www.fishbase.org)

Lungimea standard (SL): se referă la lungimea unui pește măsurat de la vârful botului până la extremitatea posterioară a ultimei vertebre sau la extremitatea posterioară a liniei laterale a pedunculului. Cu alte cuvinte, această măsurătoare exclude lungimea înotătoarei caudale. (www.fishbase.org)

Lungimea totală (LT): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și vârful lobului mai lung a înotătoarei caudale, măsurată de regulă cu lobii comprimați de-a lungul liniei laterale. Acesta este o măsurătoare în linie dreaptă, nu una măsurată urmând curbura corpului (www.fishbase.org)

Figura 1

Descrierea diferitelor lungimi folosite



Substanță chimică: O substanță sau un amestec

EC_x: (concentrație de efect pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină x % dintr-un efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere stabilit în comparație cu un control. De exemplu, o EC_{50} este concentrația estimată să producă un efect asupra unui parametru de testare în 50 % din populația expusă într-un timp de expunere stabilit.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a substanței testate la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cel observate la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, trebuie să se furnizeze o explicație completă privind modul în care a fost selectată LOEC (și, prin urmare, NOEC). Apendicele 5 și 6 oferă orientări în acest sens.

Concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) este concentrația de testare situată imediat sub LOEC, care, în comparație cu proba de control, nu are un niciun efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic ($P < 0.05$), într-un timp de expunere stabilit.

Substanță de testare: orice substanță sau amestec testat cu ajutorul prezentei metode de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produse de reacție complexă sau materiale biologice.

IUPAC: Uniunea internațională de chimie pură și aplicată.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

▼M7

Apendicele 2

CONDIȚIILE, DURATA TESTULUI ȘI CRITERIILE DE SUPRAVIEȚUIRE PENTRU SPECIILE RECOMANDATE

Specie	CONDIȚII DE TESTARE			DURATA DE TESTARE RECOMANDATĂ	Lungimea totală medie minimă a peștilor de control la sfârșitul studiului (mm) (1)	RATA DE SUPRAVIEȚUIRE A CONTROALELOR (minim)	
	Temperatura (°C)	Salinitatea ($^0/_{00}$)	Perioada de expunere la lumină (ore)			Rata de succes a eclozării	Rata de succes după eclozare
Specii de apă dulce:							
Oncorhynchus mykiss Păstrăvi curcubeu	10 ± 1,5 (2)		12 – 16 (3)	2 săptămâni după ce controalele se hrănesc la liber (sau 60 de zile după eclozare)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Pimephales promelas	25 ± 1,5		16	32 de zile de la începutul testului (sau 28 de zile după eclozare)	18	70 %	75 %
Danio rerio Peștele-zebră	26 ± 1,5		12 – 16 (4)	30 de zile după eclozare	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Oryzias latipes	25 ± 2		12 – 16 (5)	30 de zile post eclozare	17	80 %	80 %
Specii marine sau din estuar:							
Cyprinodon variegatus Cyprinodon variegatus	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 – 16 (4)	32 de zile de la începutul testului (sau 28 de zile după eclozare)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Menidia sp.	22 – 25	15-35 (5)	13	28 zile	20	80 %	60 %

Legendă:

(1) Lungimea totală medie minimă tipică nu este un criteriu de validitate, însă abaterile situate sub cifra de mai jos ar trebui examinate cu atenție în raport cu sensibilitatea testului. Lungimea totală medie minimă este derivată dintr-o selecție de date disponibile în prezent.

(2) Varietatea testată de păstrăv-curcubeu poate necesita utilizarea altor temperaturi. Populația de pești reproducători trebuie ținută la aceeași temperatură precum cea folosită pentru ouă. După primirea ouălor de la un crescător, este necesară o perioadă scurtă (de exemplu, 1-2 h) de adaptare la temperatura de testare.

(3) Întuneric pentru larve până la o săptămână după eclozare, cu excepția cazului în care se inspectează, apoi o lumină atenuată pe tot parcursul testului (12-16 ore de expunere la lumină) (4).

(4) Pentru orice condiții de testare indicate, regimul de lumină trebuie să fie constant.

(5) Pentru orice test indicat, se efectuează cu o precizie de ± $2^0/_{00}$.

▼M7

Apendicele 3

HRĂNIREA ȘI MANIPULAREA ANIMALELOR REPRODUCĂTOARE ȘI DE TESTARE PENTRU SPECIILE RECOAMNDATE

SPECIE	ALIMENTE (*)				ORA DE TRANSFER DE LA ECLOZARE	TIMPUL PÂNĂ LA PRIMA HRĂNIRE
	Pești reproducători	Larve proaspăt eclozate	Exemplare tinere			
			Tip	Frecvență		
Specii de apă dulce:						
Oncorhynchus mykiss Păstrăvi-curcubeu	Hrană pentru păstrăvi	Niciuna ($^{\alpha}$)	hrană de cultură de pornire pentru păstrăvi BSN	2-4 porții de hrană pe zi	14-16 zile de la eclozare sau când încep să urce la suprafață (nu este esențial)	19 de zile de la eclozare sau când încep să urce la suprafață
Pimephales promelas Pimephales promelas	BSN, hrană sub formă de fulgi, FBS	BSN	BSN, hrană sub formă de fulgi	2-3 ori pe zi	după eclozare este de 90 %	după 2 zile de la eclozare
Danio rerio Peștele-zebră	BSN, hrană sub formă de fulgi	hrană comercială pentru larve, protozoare ($^{\beta}$), proteine ($^{\gamma}$)	BSN48, mâncare sub formă de fulgi,	BSN o dată zilnic; hrană sub formă de fulgi de două ori zilnic	după eclozare este de 90 %	2 zile după eclozare
Oryzias latipes Oryzias latipes	hrană sub formă de fulgi	BSN, hrană sub formă de fulgi (sau protozoare sau rotifere)	BSN48, hrană sub formă de fulgi (sau rotifere)	BSN o dată zilnic; hrană sub formă de fulgi de două ori zilnic sau hrană sub formă de fulgi sau rotifere o dată zilnic	nu se aplică	6-7 zile după eliberarea gameților
Specii marine și de estuar						
Cyprinodon variegatus Cyprinodon variegatus	BSN, hrană sub formă de fulgi, FBS	BSN	BSN 48	2-3 porții de hrană pe zi	nu se aplică	1 zi de la eclozare/când încep să urce la suprafață
Menidia sp. Menidia sp.	BSN48, hrană sub formă de fulgi	BSN	BSN48	2-3 porții de hrană pe zi	nu se aplică	1 zi după eclozare/când încep să urce spre suprafață

Legendă:

(*) Hrana va fi îndestulătoare. Excedentul de hrană și fecale va fi îndepărtat după cum este necesar pentru a evita acumularea de deșeuri.

FBS creveți Artemia congelați; adulți de Artemia sp

BSN nauplii de Artemia; proaspăt eclozați

BSN48 nauplii de Artemia; vechi de 48h

($^{\alpha}$) larvele în vitellus nu necesită hrană

($^{\beta}$) filtrate din cultură mixtă

($^{\gamma}$) granule din procesul de fermentație

▼**M7**

Apendicele 4

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Componentă	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Totalul pesticidelor organoclorice și a bifenililor policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsenic	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

▼M7

Apendicele 5

RECOMANDĂRI STATISTICE PRIVIND DETERMINAREA NOEC

Generalități

Unitatea de analiză este bazinul duplicat. Astfel, pentru măsurători continue, cum ar fi dimensiunea, se va calcula media sau mediana replicilor, iar aceste valori duplicat constituie datele pentru analiză. Puterea statistică a testelor utilizate trebuie demonstrată de preferință pe baza unei memorii de date adecvată pentru fiecare laborator. Efectul dimensional care poate fi detectat cu o putere de 75-80 % trebuie să fie indicat pentru fiecare punct final al testului care urmează a fi utilizat.

Bazele de date disponibile la data elaborării prezentei metode de testare stabilesc puterea posibilă în conformitate cu procedurile statistice recomandate. Un laborator individual trebuie să își demonstreze capacitatea de a îndeplini acest criteriu de putere fie prin efectuarea de analize statistice, fie demonstrând că valoarea coeficientului de variație (CV) pentru fiecare răspuns nu depășește a 90-a procentilă din CV utilizat în elaborarea orientării tehnice. Tabelul 1 prezintă valorile CV. În cazul în care sunt disponibile doar mediile probelor sau mediane, valoarea CV din cadrul aceluiași duplicat poate fi ignorată.

Tabelul 1

A 90-a procentilă din CV pentru anumite specii de apă dulce

Specie	Răspuns	CV_între duplicate	CV_în cadrul duplicatelor
Păstrăv-curcubeu	Lungime	17,4	9,8
	Greutate	10,1	28
Pimephales promelas	Lungime	16,9	13,5
	Greutate	11,7	38,7
Peștele-zebră	Lungime	43,7	11,7
	Greutate	11,9	32,8

Pentru aproape toate testele statistice utilizate pentru evaluarea studiilor toxicologice de laborator, comparațiile de bază sunt cele între grupurile supuse tratamentului și grupul de control. Din acest motiv, nu este oportun să se solicite un test F semnificativ ANOVA înainte de a utiliza testul Dunnett sau Williams sau un test semnificativ Kruskal-Wallis înainte de a utiliza testele Konckheere-Terpstra, Mann-Whitney sau Dunn (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Testul Dunnett are o ajustare de multiplicitate încorporată, iar ratele de rezultate fals pozitive și fals negative sunt afectate în mod nefavorabil prin utilizarea testului F. În mod similar, testele Williams și Jonckheere-Terpstra regresive care folosesc un nivel de semnificație de 0,05 la fiecare pas mențin o rată totală de rezultate fals pozitive de 5 %, iar această rată și puterea statistică a testelor sunt afectate negativ de folosirea testului F sau Kruskal-Wallis. Testele Mann-Whitney și Dunn trebuie ajustate pentru multiplicitate și se recomandă folosirea ajustării Bonferroni-Holm.

O discuție aprofundată a celor mai multe dintre recomandările privind testarea ipotezei și verificarea ipotezelor care stau la baza acestor teste este disponibilă în documentul OCDE (2006), care conține, de asemenea, o bibliografie vastă.

▼M7

Tratarea probelor de control atunci când se utilizează un solvent

Dacă se utilizează un solvent, atunci trebuie incluse o probă de control cu apă de diluție și o probă de control cu solvent. Valorile celor două probe de control trebuie comparate pentru fiecare răspuns și combinate pentru analiza statistică în cazul în care nu se constată nicio diferență semnificativă între acestea. În caz contrar, proba de control cu solvent se va utiliza pentru determinarea NOEC sau estimarea EC_x, iar proba de control cu apă nu se utilizează. A se vedea restricțiile în cadrul criteriilor de validitate (punctul 7).

În ceea ce privește lungimea, greutatea, proporția de eclozare a ouălor sau de mortalitate a larvelor, numărul larvelor anormale și prima sau ultima zi de ecloziune sau când încep să urce la suprafață, se va efectua un test T sau Mann-Whitney pentru a compara proba de control cu apă de diluție și proba de control cu solvent la un nivel de semnificație de 0,05, ignorând toate grupurile supuse tratamentului. Rezultatele acestor teste trebuie raportate.

Efectuarea măsurătorilor dimensionale (lungime și greutate)

Valorile lungimii și greutății individuale ale peștilor pot fi distribuite normal sau lognormal. În ambele cazuri, valorile medii ale duplicatelor tind să fie distribuite în mod normal în temeiul teoremei centrale de limită și confirmate de datele a mai mult de 100 de studii ELS asupra a trei specii de pești de apă dulce. Alternativ, în cazul în care datele sau bazele de date anterioare sugerează o distribuție lognormală pentru valorile dimensionale individuale ale peștilor, se va calcula logaritmul mediei duplicat al valorilor peștilor individuali, iar datele pentru analiză pot fi antilogaritmuri ale acestor logaritme medii duplicat.

Datele trebuie evaluate din punct de vedere al consecvenței cu o distribuție normală și omogenitate a variației. În acest scop, trebuie utilizate reziduurile provenite de la un model ANOVA cu concentrație ca unică variabilă de clasă explicativă. Pot fi folosite determinări vizuale de la diagrame de dispersie sau histograme sau diagrame de tip „stem and leaf” (tulpină și frunze). În mod alternativ, se poate utiliza un test formal cum ar fi Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling. Consistența cu omogenitatea variației poate fi evaluată prin examinarea vizuală a aceleași diagrame de dispersie sau în mod formal din testul Levene. Doar testele parametrice (de exemplu, Williams, Dunnett) trebuie evaluate cu privire la normalitate sau omogenitatea variației.

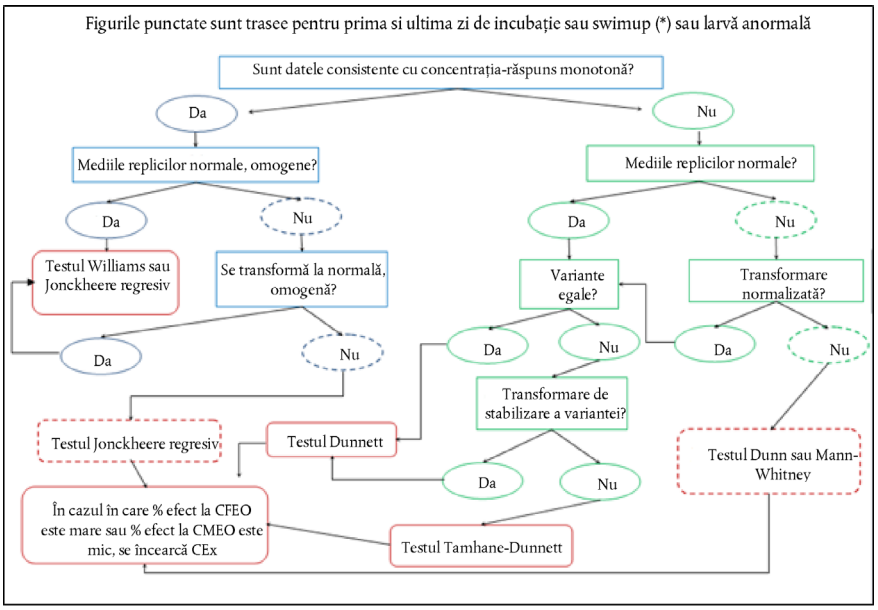
Trebuie să se acorde atenție posibilelor valori aberante și efectului lor asupra analizei. Se poate folosi testul lui Turkey pentru detectarea valorilor aberante și examinarea vizuală a aceloraşi diagrame reziduale descrise mai sus. Trebuie reamintit faptul că observațiile sunt în întregime duplicate, astfel încât omiterea unei valori aberante din cadrul analizei trebuie efectuată numai după o examinare atentă.

Testele statistice care utilizează caracteristicile proiectării testului și probabilitatea biologică sunt testele regresive precum Williams și Jonckheere-Terpstra. Aceste teste presupun o relație concentrație-răspuns monotonă, iar datele trebuie evaluate din punct de vedere al coerenței cu această ipoteză. Acest lucru poate fi efectuat vizual cu ajutorul unei diagrame de dispersie a mediilor duplicat în opoziție cu concentrația testată. Ar fi util să se suprapună această diagramă de dispersie cu o diagramă liniară pe segmente legând mediile concentrațiilor ponderate de dimensiunea probei duplicat. O abatere majoră a diagramei liniare pe segmente de la monotonicitate ar indica o posibilă necesitate de a utiliza teste de non-tendință. Alternativ, se pot utiliza teste formale. Un test formal simplu este de a calcula contrastele lineare și pătratice ale mediilor concentrațiilor. În cazul în care contrastul pătratic este semnificativ, iar cel linear nu este, acest lucru poate fi o indicație a unei eventuale probleme legate de monotonicitate care trebuie evaluată ulterior pe baza diagramelor. Acolo unde normalitatea sau omogeneitatea variației pot constitui o problemă, aceste contraste pot fi construite pe baza datelor transformate. Pot fi folosite proceduri alternative, cum ar fi testul Bartholomew pentru monotonicitate, însă acestea adaugă complexitate.

▼M7

Figura 2

Diagrama NOEC cu măsurători dimensionale (lungime și greutate)



(*) aceste răspunsuri nu satisfac niciodată ipotezele privind analizele sau modelele parametrice

Cu excepția cazului în care datele nu sunt consecvente cu cerințele pentru aceste teste, NOEC se determină printr-o aplicare regresivă a testului Williams sau Jonckheere-Terpstra. OCDE (2006) oferă detalii cu privire la aceste proceduri. Pentru datele care nu sunt conforme cu cerințele testului de stabilire a tendinței, poate fi folosit testul Dunnett sau testul TamhaneDunnett (T3), ambele având încorporate ajustări pentru multiplicitate. Aceste teste presupun normalitate și, în cazul testului Dunnett, omogeneitatea variației. În cazul în care aceste condiții nu sunt îndeplinite, se poate folosi testul non-parametric Dunn. OCDE (2006) conține detalii privind toate aceste teste. Figura 2 oferă o imagine de ansamblu asupra modalităților de a alege un test.

Eclozarea ouălor și supraviețuirea larvelor

Datele sunt proporțiile de ouă care eclozează sau de larve care supraviețuiesc în probele duplicat individuale. Aceste proporții trebuie evaluate din punct de vedere al variației extra-binomiale, care este comună dar nu universală pentru astfel de măsurători. Diagrama din figura 3 oferă orientări pentru alegerea testului; a se vedea textul pentru descrieri detaliate.

Două teste sunt utilizate în mod obișnuit. Acestea sunt testul Tarone C (α) Ttarone, 1979) și testul chi-pătrat, fiecare aplicat separat fiecărei concentrații de testare. În cazul în care se constată varianța extra-binomială chiar și într-o singură concentrație de testare, trebuie utilizate metode potrivite.

Formula 1

Testul Tarone C (α) (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \left(\frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} \right) - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

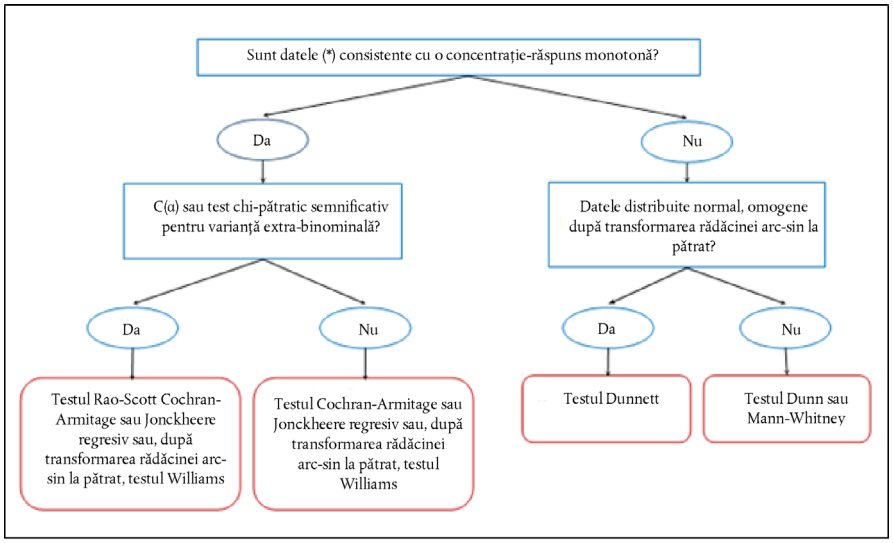
acolo unde $\hat{p}$ este proporția medie pentru o concentrație dată, **m** este numărul de bazine duplicat, $\mathbf{n_j}$ este numărul subiecților din proba duplicat **j**și $\mathbf{x_j}$ este numărul

▼M7

subiecților din proba duplicat care răspund, de exemplu care nu au eclozat sau care au murit. Acest test se aplică separat fiecărei concentrații. Acest test poate fi văzut ca un test chi-pătrat ajustat, însă simulările de putere limitată efectuate de Tarone au demonstrat că acesta este mai puternic decât un test chi-pătrat.

Figura 3

Diagrama NOEC privind eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor



(*) Datele sunt proporționale cu fiecare duplicat.

În cazul în care nu există dovezi semnificative de varianță extra-binomială, poate fi utilizat testul Cochran-Armitage regresiv. Acest test ignoră probele duplicat, așadar în cazurile în care există astfel de dovezi, se recomandă ajustarea Rao-Scott adusă testului Cochran-Armitage (RSCA) care ia în considerare probele duplicat, mărimile acestora și varianța extrabinomială. Testele alternative includ testul Williams și Jonckheere-Terpstra regresiv, precum și testul Dunnett astfel cum a fost descris în vederea efectuării măsurătorilor dimensionale. Aceste teste se aplică indiferent dacă se înregistrează sau nu o varianță extrabinomială, însă au o putere oarecum mai scăzută (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Prima sau ultima zi de ecloziune sau de urcare la suprafață

Răspunsul este un număr întreg indicând data de testare la care observația respectivă este efectuată pentru un bazin duplicat dat. Intervalul de valori este în general foarte limitat și există adesea proporții ridicate de valori apropiate, de exemplu, aceeași primă zi de eclozare se observă în toate probele duplicat și, eventual, în una sau două concentrații de testare scăzute. Testele parametrice precum Williams și Dunnett nu sunt adecvate pentru astfel de date. Cu excepția cazului în care există dovezi privind o lipsă semnificativă de monotonicitate, testul Jonckheere-Terpstra regresiv este foarte puternic pentru detectarea efectelor substanței chimice testate. În caz contrar, se poate utiliza testul Dunn.

Anomaliile larvelor

Răspunsul este numărul de larve care s-au dovedit anormale într-un mod sau altul. Acest răspuns are adesea o incidență scăzută și prezintă uneori aceleași probleme precum prima zi de ecloziune, dar înregistrează uneori nereguli privind relația concentrație-răspuns. În cazul în care datele urmează aproximativ forma unei concentrații de tip monoton, testul Jonckheere-Terpstra regresiv este puternic pentru detectarea efectelor. În caz contrar, se poate utiliza testul Dunn.

▼**M7**

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.Mai multe sume, comparații cu rang technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) – A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L.Robertson, T., Wright F.T., și dykstra R.L. (1988); (1988); Order restricted statistical inference, Wiley..

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D. A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Apendicele 6

RECOMANDĂRI STATISTICE PENTRU ESTIMĂRILE REGRESIEI

Generalități

Observațiile utilizate pentru ajustarea unui model reprezintă mediile duplicat (lungime și greutate) sau proporțiile duplicat (eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor) (OCDE 2006).

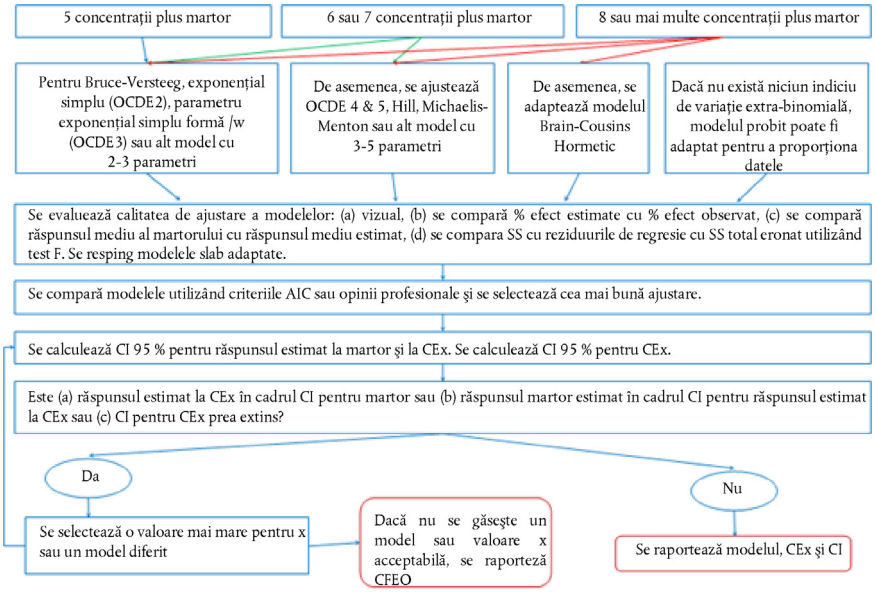
În general, se recomandă o analiză de regresie ponderată folosind ca pondere dimensiunea probei duplicat. Sunt posibile, de asemenea, alte scheme de ponderare, cum ar fi analiza ponderată folosind răspunsul mediu estimat sau o combinație a acesteia cu dimensiunea probei duplicat. Nu se recomandă ponderarea cu varianța reciprocă în cadrul aceleiași probe (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Orice transformare a răspunsurilor înainte de a fi supuse analizei trebuie să păstreze independența observațiilor și ECx și limitele de încredere trebuie exprimate în unitățile de măsură inițiale, mai degrabă decât în unități transformate. De exemplu, o schimbare de 20 % în logaritmul de lungime nu este echivalentă cu o schimbare de 20 % în lungime (Lyles *et.al* 2008, Draper and Smith 1999).

Diagrama din figura 4 oferă o prezentare generală a estimărilor ECx. Detaliile sunt descrise în textul de mai jos.

Figura 4

Diagrama de flux pentru estimarea ECx a lungimii și greutății medii duplicat, sau a proporției eclozării ouălor sau mortalității larvelor, a se vedea textul pentru detalii suplimentare



Considerații privind eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor

În ceea ce privește eclozarea ouălor și mortalitatea larvelor, în general este mai bine să se ajusteze un model descrescător, cu excepția cazului când se ajustează un model probit conform descrierii de mai jos. Cu alte cuvinte, trebuie să se modeleze proporția ouălor care nu eclozează sau a larvelor care nu supraviețuiesc. Motivul constă în faptul că ECx se referă la o concentrație la care există o schimbare egală cu x % din răspunsul mediei probelor de control. În cazul în care 5 % din ouăle de control nu eclozează și se modelează numărul celor care nu reușesc să eclozeze, EC20 se referă la o concentrație la care există o schimbare egală cu 20 % din procentul de 5 % din proba de control care a eșuat să eclozeze, ceea ce înseamnă o schimbare de 0,2 * 0,05 = 0,01 sau 1 punct

▼M7

procentual la 6 % de eșec al ecloziunii. O astfel de modificare minoră nu poate fi estimată în mod semnificativ din datele disponibile și nu este importantă din punct de vedere biologic. Cu toate acestea, dacă se modelează proporția de ouă care eclozează, proporția probei de control va fi de 95 % în acest caz, iar o reducere de 20 % din media probei de control va însemna o schimbare de 0,95*0,2=0,18, ajungându-se astfel de la o rată de succes a eclozării de 95 % la una de 77 % (= 95-18), iar concentrația de efect poate fi estimată și prezintă probabil un interes major. Aceasta nu reprezintă o problemă în cazul măsurătorilor dimensionale, deși în general efectele adverse asupra dimensiunii echivalează cu o scădere a dimensiunii.

Modele pentru dimensiune (lungime sau greutate) și rata de succes a ecloziunii sau rata de supraviețuire a larvelor

Cu excepția modelului hormetic Brain-Cousens, toate aceste modele sunt descrise și recomandate de OCDE (2006). Așa-numitele OCDE 2-5 sunt discutate, de asemenea, în Slob (2002) cu privire la testele de ecotoxicitate. Există, bineînțeles, multe alte modele care ar putea fi utile. Bunke, *et al*. (1999) enumeră mai multe modele care nu sunt incluse aici și conține nenumărate referințe la alte modele. Modelele enumerate mai jos sunt propuse ca fiind deosebit de adecvate în testele de ecotoxicitate și foarte frecvent folosite.

Cu 5 concentrații de testare plus control

— Bruce-Versteeg

— Exponențială simplă (OCDE 2)

— Exponențială cu parametru de formă (OCDE 3)

— Exponențială simplă cu limită inferioară (OCDE 4)

Cu 6 sau mai multe concentrații de testare plus control

— Exponențială cu parametru de formă și limita inferioară (OCDE 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

În cazul în care există probe vizuale de hormeză (puțin probabil în cazul eclozării reușite sau al larvelor supraviețuitoare, dar observate uneori în observațiile dimensionale)

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Modele alternative pentru eșecul eclozării ouălor și mortalitatea larvelor

— Modele suplimentare pentru aceste răspunsuri pot fi ajustate utilizând modele probit (sau logistice), cu condiția să nu existe nicio dovadă de variață extra-binomială, iar incidența controlului să fie menționată în corespondența modelului. Aceasta nu este metoda preferată, întrucât folosește ca unitate de analiză probele individuale și nu proba duplicat (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Concordanța unui model unic

— Se compară vizual scăderea procentuală observată și preconizată pentru fiecare concentrație de testare (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper și Smith 1999).

— Se compară eroarea pătratică medie regresivă cu eroarea pătratică medie pură folosind un test F (Draper and Smith 1999).

— Se verifică dacă fiecare termen din model este semnificativ diferit de zero (și anume, se determină dacă toți termenii din model sunt importanți), (Motulsky și Christopoulos, 2004).

▼M7

— Diagramele reziduurilor provenite de la concentrația de testare vs. concentrația de regresie, posibil la o scară logaritmică (conc.). Nu ar trebui să existe un tipar pentru această diagramă, punctele ar trebui să fie dispersate în mod aleatoriu de-a lungul unei linii orizontale la înălțime zero.

— Datele trebuie evaluate din punct de vedere al normalității și omogeneității variației, astfel cum este indicat în apendicele 5.

— În plus, normalitatea reziduurilor cu privire la modelul de regresie se evaluează folosind metodele indicate în apendicele 5 pentru reziduurile provenite de la analiza de variață.

Compararea modelelor

— Se utilizează criteriul informațional Akiake (AIC). Valori mai mici ale AIC indică o compatibilitate mai bună, iar dacă AICc(B)-AICc(A)≥10, modelul A este cu siguranță mai bun decât modelul B (Motulsky and Christopoulos (2004).

— Se compară vizual cele două modele evidențiind în ce proporție îndeplinesc criteriul modelului unic de mai sus.

— Se recomandă principiul parcimoniei, conform căruia se utilizează modelul cel mai simplu care corespunde datelor în mod rezonabil (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Calitatea estimării ECx

Intervalul de încredere (CI) pentru ECx trebuie să fie limitat. Este necesară o apreciere statistică pentru a determina limitele intervalului de încredere astfel încât ECx să fie în continuare utilă. Simulările privind modele regresive adecvate pentru eclozarea ouălor și datele dimensionale arată că aproximativ 75 % din intervalele de încredere pentru ECx (x = 10, 20 sau 30) nu calibrează mai mult de două concentrații de testare. Aceasta oferă un ghid general pentru ceea ce este acceptabil și un ghid practic pentru ceea ce este realizabil. Numeroși autori afirmă necesitatea de a raporta intervalele de încredere pentru toți parametrii modelului, iar intervalele mari de încredere pentru parametrii modelului indică modele inacceptabile (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al*. 1999, Environment Canada 2005).

Intervalul de încredere pentru ECx (sau oricare alt parametru al modelului) nu trebuie să conțină cifra zero (Motulsky and Christopoulos 2004). Aceasta este regresia echivalentă cu o diferență semnificativă minimă, citată adesea în abordările verificărilor de ipoteză (de exemplu Wang et al., 2000). Aceasta corespunde, de asemenea, intervalului de încredere pentru ca răspunsurile medii la LOEC să nu conțină media probelor de control. Trebuie să ne întrebăm dacă estimările parametrilor sunt plauzibile din punct de vedere științific. De exemplu, dacă intervalul de încredere pentru y0 este ± 20 %, nu este plauzibilă nicio estimare EC_{10}. În cazul în care modelul estimează un efect de 20 % la o concentrație C, iar efectul maxim observat la concentrația C și la concentrații mai mici este de 10 %, atunci EC_{20} nu este plauzibilă (Motulsky și Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

ECx nu trebuie să necesite o extrapolare în afara intervalului de concentrații pozitive (Draper și Smith 1999, OCDE 2006). De exemplu, o recomandare generală ar fi ca ECx să nu se situeze cu mai mult de 25 % sub cea mai scăzută concentrație testată sau deasupra celei mai mari concentrații testate.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼**M7**

Bunke droge, B., O., şi polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & FII.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. poindexter Evans, M. Brown, A., şi C.R. Cooper (2008); Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878-886.

Morgan, B.J.T (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.Principii de regresie neliniară, Journal of Industrial microbiologie 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. TEST DE REPRODUCERE DE DURATĂ SCURTĂ LA PEȘTI

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea privind testarea (TG) nr. 229 a OCDE (2012). Necesitatea dezvoltării și a validării unui test pe pești capabil să detecteze anumite substanțe chimice active endocrin își are originea în preocupările referitoare la faptul că anumite niveluri de substanțe chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât asupra oamenilor, cât și asupra faunei sălbatice din cauza interacțiunii respectivelor substanțe chimice cu sistemul endocrin. În 1998, OCDE a inițiat o activitate prioritară de revizuire a orientărilor existente și de elaborare a unor noi orientări pentru screeningul și testarea unor potențiali perturbatori endocrini. Un element al acestei activități a constat în elaborarea unei orientări de testare pentru screeningul substanțelor chimice active asupra sistemului endocrin al unor specii de pești. Testul de reproducere cu durată scurtă pe pești a făcut obiectul unui amplu program de validare constând în studii interlaboratoare cu substanțe chimice selectate pentru a demonstra relevanța și fiabilitatea testului de detectare a substanțelor chimice care afectează reproducerea la pește prin diferite mecanisme, inclusiv endocrine (1, 2, 3, 4, 5). Toate punctele finale ale Orientării de testare a OCDE au fost validate pentru *Pimephales promelas* și un subset de puncte finale a fost validat pentru *Oryzias latipes* (și anume, vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare) și pentru peștele-zebră (și anume, vitelogenina). Activitatea de validare a fost revizuită inter pares de către un grup de experți desemnați de coordonatorii naționali ai programului OCDE privind testarea (6), în parte, și de un grup independent de experți solicitat de Agenția pentru protecția mediului din Statele Unite (29). Testul nu este conceput să identifice mecanisme specifice de perturbare hormonală deoarece animalele testate au axul hipotalamo-hipofizo-gonadal (*HPG*) intact, care poate reacționa la substanțele chimice care au efecte asupra axului HPG la diferite niveluri.

2. Această metodă de testare descrie un test de screening *in vivo* în cadrul căruia pești masculi maturi din punct de vedere sexual și pești femele ovulante sunt ținuți împreună și expuși la o substanță chimică pe parcursul unei durate limitate a ciclului lor de viață (21 de zile). La finalul perioadei de expunere de 21 de zile, doi markeri biologici finali sunt măsurați la masculi și la femele, ca indicatori ai activității endocrine a substanței chimice testate; acești markeri sunt vitelogenine și caracteristicile sexuale secundare. Vitelogenina se măsoară la *Pimephales promelas*, la *Oryziaslatipes* și la peștele-zebră, în timp ce caracteristicile sexuale secundare se măsoară la *Pimephales promelas* și la O*ryziaslatipes*. În plus, fecunditatea cantitativă este monitorizată zilnic, pe toată durata testului. De asemenea, gonadele sunt păstrate și pot fi evaluate din punct de vedere histopatologic pentru a măsura capacitatea de reproducere a animalelor testate și pentru a spori forța probatorie a altor puncte finale.

3. Acest test biologic servește drept test de screening *in vivo* asupra reproducerii, iar aplicarea sa trebuie considerată în contextul Cadrului conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (30). În acest cadru conceptual, testul de reproducere pe termen scurt la pești este propus la nivelul 3 ca un test *in vivo* care furnizează date cu privire la mecanismul (mecanismele)/calea (căile) endocrin(e),

CONSIDERAȚII INIȚIALE ȘI LIMITĂRI

4. Vitelogenina (VTG) este produsă în mod normal de ficatul femelelor vertebrate ovipare ca răspuns la circulația estrogenului endogen. Aceasta este un precursor al proteinelor din vitellus și, după ce este produsă în ficat, circulă prin sânge la ovar, unde este absorbită și modificată de ouăle în dezvoltare. Vitelogenina este aproape nedetectabilă în plasma peștilor imaturi, femele și masculi, deoarece aceștia nu au suficient estrogen circulant; cu toate acestea, ficatul are capacitatea de a sintetiza și a secreta vitelogenină ca răspuns la o stimulare estrogenică exogenă.

▼M7

5. Măsurarea vitelogeninei contribuie la detectarea substanțelor chimice cu diferite moduri estrogenice de acțiune. Detectarea substanțelor chimice estrogenice este posibilă prin măsurarea inducției vitelogeninei la peștii masculi și a fost amplu documentată în literatura științifică de specialitate revizuită *inter-pares* [de exemplu (7)]. Inducția vitelogeninei a fost demonstrată, de asemenea, în urma expunerii la androgeni aromatizabili (8, 9). O reducere a nivelului de estrogen circulant la femele, de exemplu prin inhibarea aromatazei care transformă androgenul endogen în estrogenul natural 17β-estradiol, determină o reducere a nivelului de VTG, care se utilizează pentru detectarea substanțelor chimice cu proprietăți de inhibare a aromatazei (10, 11). Relevanța biologică a răspunsului vitelogeninei ca urmare a inhibării estrogenice/a aromatazei este bine stabilită și a fost amplu documentată. Cu toate acestea, este posibil ca producția de VTG la femele să fie afectată, de asemenea, de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice non-endocrine, de exemplu de hepatotoxicitate.

6. Mai multe metode de măsurare au fost dezvoltate cu succes și standardizate pentru utilizarea de rutină. Acestea includ metodele cu specificitate de specie utilizând testul de imunoabsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), în care se utilizează imunochimia pentru a cuantifica vitelogenina produsă în probe mici de sânge sau hepatice prelevate de la pești individuali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Pentru măsurarea vitelogeninei, de la *Pimephales promelas* se prelevează probe de sânge, de la peștele-zebră se prelevează probe de sânge sau omogenat din cap/coadă, iar de la *Oryzias latipes* se prelevează probe hepatice. În cazul *Oryzias latipes*, există o bună corelație între vitelogenina măsurată în sânge și cea măsurată în ficat (19). În apendicele 6 sunt descrise procedurile recomandate pentru prelevările efectuate în scopul măsurării vitelogeninei. Seturile pentru măsurarea vitelogeninei sunt disponibile pe scară largă; acestea trebuie să fie bazate pe o metodă ELISA validată, cu specificitate de specie.

7. Caracteristicile sexuale secundare ale peștilor masculi din anumite specii sunt vizibile la exterior, cuantificabile și sensibile la nivelurile de androgeni endogeni circulanți; acesta este cazul pentru *Pimephales promelas* și pentru *Oryzias latipes* – însă nu și pentru peștele-zebră, care nu are caracteristici sexuale secundare cuantificabile. Femelele își păstrează capacitatea de a dezvolta caracteristici sexuale secundare masculine atunci când sunt expuse la substanțe chimice androgenice din apă. În literatura de specialitate există mai multe studii pentru a documenta acest tip de răspuns în cazul *Pimephales promelas* (20) și *Oryzias latipes* (21). O atenuare a caracteristicilor sexuale secundare ale masculilor ar trebui interpretată cu prudență din cauza puterii statistice mici și ar trebui să fie bazată pe opiniile experților și pe greutatea dovezilor. Există limitări în ceea ce privește utilizarea peștelui-zebră în acest test din cauza absenței caracteristicilor sexuale secundare cuantificabile sensibile la substanțe chimice cu efecte androgenice.

8. În cazul *Pimephales promelas*, principalul indicator al expunerii la androgeni exogeni este numărul de tuberculi nupțiali situați pe botul femelei. În cazul femelelor de *Oryzias latipes*, numărul de procese papilare constituie principalul indicator al expunerii exogene la substanțe chimice cu efecte androgenice. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale ale *Pimephales promelas* și, respectiv, ale *Oryzias latipes* sunt indicate în apendicele 5A și în apendicele 5B.

9. Testul de 21 de zile pe pești include evaluarea cantitativă a producției de ouă și conservarea gonadelor pentru o eventuală examinare histopatologică. Unele autorități de reglementare pot solicita acest punct final suplimentar pentru o evaluare mai completă a capacității de reproducere a animalelor testate sau în cazurile în care vitelogenina și caracteristicile sexuale secundare nu au răspuns la expunerea la substanțele chimice. Deși unele puncte finale pot reprezenta o metodă de diagnosticare foarte importantă (de exemplu, inducția VTG la masculi și formarea de tuberculi la femele), nu toate punctele finale (de exemplu, fertilitatea și histopatologia gonadei) ale acestui test sunt concepute pentru a identifica în mod clar mecanismele celulare specifice de acțiune. Mai degrabă, seria de puncte finale permite la nivel colectiv realizarea de interferențe în ceea ce privește posibilele perturbări endocrine și, prin urmare, oferă recomandări pentru teste suplimentare. Deși nu este specifică sistemului endocrin, fertilitatea, datorită

▼M7

sensibilității demonstrate la substanțele chimice active endocrin (5), trebuie inclusă ca un parametru important deoarece, atunci când aceasta împreună cu alte metode nu sunt afectate, există mai multe șanse ca un compus să nu fie activ endocrin. Cu toate acestea, în cazul în care fertilitatea este afectată, acest lucru va influența în mare măsură forța probatorie a interferențelor. Recomandări cu privire la interpretarea datelor de testare și acceptarea rezultatelor sunt prezentate în detaliu în această metodă de testare.

10. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

11. În cadrul testului, masculii și femelele aflați în stadiu de reproducere sunt expuși împreună în vase de testare. Stadiul de adult și cel reproducător permite o diferențiere clară a fiecărui sex și, în consecință, o analiză a fiecărui punct final în funcție de sex, și asigură sensibilitatea acestora la substanțe chimice exogene. La finalul testului, sexul este confirmat printr-o examinare macroscopică a gonadelor după incizia ventrală a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci. O prezentare generală a condițiilor relevante de biotestare este redată în apendicele 2. Testul se efectuează în mod normal pe pești selectați dintr-o populație capabilă să elibereze gameți; nu trebuie utilizate animale senescente. Orientări privind vârsta peștilor și stadiul de reproducere al acestora sunt oferite în secțiunea privind selectarea speciei de pești. Testul este realizat utilizând trei concentrații de expunere la substanțe chimice, precum și un vas de control cu apă și un vas de control cusolvent, dacă este necesar. Pentru fiecare tratament se utilizează două vase sau vase duplicat (fiecare vas conținând 5 masculi și 5 femele) în cazul peștelui-zebră. În cazul *Pimephales promelas,* se utilizează patru vase sau vase duplicat pentru fiecare tratament (fiecare vas conținând 2 masculi și 4 femele). Acest principiu permite acomodarea comportamentului teritorial al masculului de *Pimephales promelas,* menținând în aceleași timp o putere suficientă a testului. În cazul *Oryzias latipes*, se utilizează patru vase sau vase duplicat pentru fiecare tratament (fiecare vas conținând 3 masculi și 3 femele). Expunerea se realizează timp de 21 de zile, iar prelevarea de probe de la pești se efectuează în cea de a 21-a zi de expunere. Fertilitatea cantitativă este monitorizată zilnic.

12. După prelevarea de probe în cea de a 21-a zi, toate animalele sunt eutanasiate. Caracteristicile sexuale secundare se măsoară în cazul *Pimephales promelas* și în cazul *Oryzias latipes* (a se vedea apendicele 5A și apendicele 5B); se prelevează probe de sânge pentru determinarea vitelogeninei de la peștele-zebră și de la *Pimephales promelas*, ca alternativă se pot preleva probe de la cap/coadă pentru determinarea vitelogeninei la peștele-zebră (apendicele 6); pentru măsurarea VTG în cazul *Oryzias latipes* se prelevează probe din ficat (apendicele 6); gonadele sunt fixate fie în întregime sau disecate pentru o eventuală evaluare histopatologică (22).

CRITERIILE DE ACCEPTARE A TESTULUI

13. Pentru ca rezultatele testului să fie acceptabile, acesta trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

— mortalitatea din vasele de control cu apă (sau cu solvent) nu trebuie să depășească 10 procente la sfârșitul perioadei de expunere;

— concentrația oxigenului dizolvat trebuie să fie pe toată durata testului de cel puțin 60 % din valoarea de saturație din aer (VSA);

— temperatura apei nu trebuie să difere cu mai mult de ± 1,5 °C între vasele de testare în niciun moment pe parcursul perioadei de expunere și trebuie să fie menținută într-un interval de 2 °C în limitele de temperatură specificate pentru speciile testate (apendicele 2);

— trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ±20 % din valorile medii măsurate;

▼M7

— dovezi că peștii eliberează gameți în mod activ în toate vasele duplicat înainte de inițierea expunerii la substanța de testat și în toate vasele de control duplicat pe parcursul testului.

DESCRIEREA METODEI

Aparatura

14. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:

a. aparat de măsurare a oxigenului și pH-metru;

b. echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

c. aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;

d. bazine din material chimic inert și de capacitate adaptată la încărcarea și la densitatea populației recomandate (a se vedea apendicele 2);

e. substrat de reproducere pentru *Pimephales promelas* și peștele-zebră; apendicele 4 conține detaliile necesare;

f. balanță cu precizie adecvată (adică precizie de ± 0,5 mg).

Apa

15. În cadrul testului poate fi utilizat orice tip de apă în care specia testată supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată corespunzătoare. Apa trebuie să fie de calitate constantă pe durata testului. Aceasta trebuie să aibă un pH cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui test pH-ul trebuie să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități. Pentru a garanta faptul că apa de diluție nu influențează în mod negativ rezultatul testului (de exemplu, prin formarea de complecși ai substanței chimice utilizate în testare) trebuie prelevate periodic probe pentru analiză. De exemplu, la fiecare trei luni trebuie măsurate metale grele (ex., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, și Ni), anioni și cationi majori (ex., Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} și SO_4^{2-}), pesticide (de exemplu, organofosforice totale și organoclorurate totale), carbon organic total și solide în suspensie în cazul în care apa de diluție este cunoscută ca fiind de o calitate relativ constantă. Dacă s-a demonstrat că apa are calitate constantă pe parcursul unei perioade de cel puțin un an, analizele se pot efectua la intervale mai mari (de exemplu, la fiecare șase luni). Anumite caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 3.

Soluții de testare

16. Soluțiile de testare în concentrațiile date se prepară prin diluarea unei soluții stoc. Soluția stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței de testare în apa de diluție utilizând mijloace mecanice (de exemplu, un agitator sau cu ajutorul ultrasunetelor). Pentru obținerea unei soluții stoc cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane de saturare (coloane de solubilitate). Nu se recomandă utilizarea unui solvent purtător. Cu toate acestea, în cazul în care este necesară utilizarea unui solvent, trebuie testat în paralel un vas de control cu solvent la aceeași concentrație precum cea a substanțelor chimice utilizate în tratamente. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, un solvent poate constitui cea mai bună soluție din punct de vedere tehnic; trebuie consultat documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (23). Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței sau amestecului. Documentul de orientare al OCDE recomandă să nu se depășească o concentrație maximă de 100µl/l. Cu toate acestea, o analiză recentă (24) a evidențiat preocupări suplimentare generate de utilizarea solvenților pentru testarea activității endocrine. Prin urmare, se recomandă reducerea la minimum a concentrației solventului, dacă este necesar, atunci când este posibil din punct de vedere tehnic (în funcție de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testare).

▼M7

17. Va fi utilizat un sistem de testare cu flux continuu. Un astfel de sistem alimentează și diluează continuu o soluție stoc conținând substanța chimică de testare (de exemplu, pompă dozatoare, diluator proporțional, sistem de saturare) pentru a furniza o serie de concentrații în incintele de testare. Debitele soluțiilor stoc și ale apei de diluție trebuie verificate periodic, de preferință zilnic, pe durata testului și trebuie să nu varieze cu mai mult de 10 % pe parcursul întregului test. Trebuie evitată utilizarea unor tuburi din plastic de calitate inferioară sau a altor materiale care pot conține substanțe biologic active. În momentul selectării materialului pentru sistemul de testare cu flux continuu, trebuie luată în considerare posibila adsorbție a substanței de testare de materialul respectiv.

Manipularea peștilor

18. Peștii de testare trebuie selectați dintr-o populație de laborator, de preferință dintr-un singur stoc, care a fost aclimatizată timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de expunere la lumină similare celor utilizate în test. Este important ca rata de încărcare și densitatea populației (pentru definiții, a se vedea apendicele 1) să fie adecvate pentru speciile utilizate în cadrul testului (a se vedea apendicele 2).

19. După o perioadă de aclimatizare de 48 de ore, se înregistrează mortalitățile și se aplică următoarele criterii:

— mortalități mai mari de 10 % din populație în șapte zile: se respinge întregul lot;

— mortalități între 5 % și 10 % din populație: aclimatizare timp de alte șapte zile; dacă mortalitatea este mai mare de 5 % în cursul celei de a doua perioade de șapte zile, se respinge întregul lot;

— mortalități mai mici de 5 % din populație în șapte zile: se acceptă întregul lotul.

20. Peștii nu trebuie tratați de boli pe parcursul perioadei de aclimatizare, în perioada de preexpunere sau pe parcursul perioadei de expunere.

Preexpunerea și selectarea peștilor

21. Se recomandă o perioadă de preexpunere de o săptămână pe parcursul căreia animalele sunt introduse în vase similare cu cele utilizate în cadrul testului propriu-zis Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* pe parcursul întregii perioade de reținere și în faza de expunere. Faza de expunere începe cu pești adulți dimorfici din punct de vedere sexual selectați dintr-o populație de animale de laborator mature din punct de vedere reproductiv (de exemplu, prezentând caracteristici sexuale secundare clare, vizibile în cazul *Pimephales promelas* și al *Oryzias latipes*) și care eliberează activ gameți. Exclusiv pentru o orientare generală (și fără ca acest fapt să fie luat în considerare independent de observarea stadiului efectiv de reproducere al unui anumit lot de pești), *Pimephales promelas* trebuie să aibă aproximativ 20 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. *Oryzias latipes* trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la o temperatură de 25±2 °C pe parcursul întregii lor vieți. Peștii-zebră trebuie să aibă aproximativ 16 (± 2) săptămâni, presupunând că au fost crescuți la 26 ± 2 °C pe parcursul întregii lor vieți. Producția de ouă trebuie evaluată zilnic pe parcursul fazei de preexpunere. Se recomandă ca eliberarea gameților să fie observat[în toate bazinele duplicat înainte de includerea în faza de expunere a testului. Orientări cantitative privitoare la producția zilnică oportună de ouă nu pot fi furnizate în acest stadiu, dar s-a observat o medie mai mare de 10 ouă/femelă/zi pentru fiecare specie. Un protocol de dispunere aleatorie a blocurilor, conform ratei de producție a ouălor, trebuie folosit pentru a repartiza duplicatele diverselor niveluri de testare în vederea asigurării unei distribuiri echilibrate a duplicatelor.

▼M7

PROTOCOLUL TESTULUI

22. Se utilizează trei concentrații ale substanței chimice de testare, un vas de control (apă) și, dacă este necesar, un vas de control cu solvent. Datele pot fi analizate pentru a determina diferențele semnificative din punct de vedere statistic între răspunsurile corespunzătoare vaselor supuse tratamentului și vaselor de control. Aceste analize vor oferi informații cu privire la necesitatea efectuării unor teste suplimentare pe termen mai lung pentru a se detecta posibile efecte adverse (și anume, asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) ale substanței chimice, mai degrabă decât pentru utilizare în cadrul evaluării riscurilor (25).

23. În cazul peștelui-zebră, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculii și femelele din fiecare nivel de tratament (5 masculi și 5 femele din fiecare dintre cele două vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina. În cazul *Oryzias latipes*, în cea de a 21-a zi a experimentului, sunt prelevate probe de la masculii și femelele din fiecare nivel de tratament (3 masculi și 3 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare. În cazul *Pimephales promelas*, în cea de a 21-a zi de expunere, sunt prelevate probe de la masculii și femelele (2 masculi și 4 femele din fiecare dintre cele patru vase duplicat) și din vasul sau vasele de control pentru a măsura vitelogenina și a evalua caracteristicile sexuale secundare. Evaluarea cantitativă a fecundității este necesară, iar țesuturile gonadelor trebuie fixate în întregime sau disecate pentru o posibilă evaluare histopatologică, dacă este necesar.

Selectarea concentrațiilor de testare

24. În scopurile acestui test, cea mai mare concentrație de testare trebuie stabilită fie la concentrația maximă tolerată (CMT), obținută cu ajutorul unei metode de determinare a intervalului sau din alte date privind toxicitatea, fie la valoarea de 10 mg/l, fie la valoarea corespunzătoare solubilității maxime în apă, oricare este cea mai mică. CMT este definită ca fiind cea mai mare concentrație de testare a substanței chimice având ca rezultat o rată a mortalității mai mică de 10 %. Utilizarea acestei metode presupune existența unor date empirice privind toxicitatea acută sau a altor date privind toxicitatea pe baza cărora poate fi estimată CMT. Estimarea CMT poate fi inexactă și, în general, necesită o anumită judecată profesională.

25. Sunt necesare trei concentrații de testare, diferențiate printr-un factor constant care nu depășește valoarea 10, un control cu apă de diluție (și un control cu solvent, dacă este necesar). Se recomandă ca factorii de diferențiere să se încadreze în intervalul 3,2 și 10.

MOD DE OPERARE

Selectarea și cântărirea peștilor pentru testare

26. Este important ca diferențele de greutate între pești să fie reduse la minim la începutul testului. În apendicele 2 sunt prezentate intervalele recomandate de mărime corespunzătoare diferitelor specii pentru acest test. Pentru întregul lot de pești utilizați în cadrul testului, intervalul greutăților individuale ale masculilor și femelelor la începutul testului trebuie menținut, dacă este posibil, în limita de ± 20 % din media aritmetică a greutății fiecărui sex. Se recomandă cântărirea unui subeșantion din stocul de pești înainte de testare pentru a estima greutatea medie.

Condiții de expunere

Durată

27. Durata testului este de 21 de zile, după o perioadă de preexpunere. Perioada de preexpunere recomandată este de una până la două săptămâni.

Hrănirea

28. Peștii trebuie hrăniți *ad libitum* cu hrană corespunzătoare (apendicele 2) într-o cantitate suficientă pentru menținerea condiției fizice. Trebuie evitată proliferarea microbilor și apariția turbidității apei. Ca orientare generală, rația

▼M7

zilnică poate fi împărțită în două sau trei porții egale administrate de mai multe ori pe zi, la intervale de cel puțin trei ore. Se acceptă o singură rație mai mare, în special în weekend-uri. Peștii nu trebuie hrăniți timp de 12 ore înainte de prelevarea probelor/necropsie.

29. Hrana peștilor trebuie evaluată pentru a detecta contaminanți precum pesticide organoclorurate, hidrocarburi aromatice policiclice (HAP), bifenili policloruraţi (BPC). Trebuie evitate alimentele cu un nivel înalt de fitoestrogeni care ar compromite răspunsul în cadrul testului la un agonist de estrogen cunoscut (de exemplu, 17b- estradiol).

30. Hrana neconsumată și materiile fecale trebuie înlăturate din vasele de testare cel puțin de două ori pe săptămână, de exemplu prin curățarea cu grijă a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon.

Lumina și temperatura

31. Perioada de expunere la lumină și temperatura apei trebuie să fie adecvate pentru specia testată (apendicele 2).

Frecvența determinărilor și măsurătorilor analitice

32. Înainte de începerea perioadei de expunere, trebuie asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Trebuie stabilite toate metodele analitice necesare, inclusiv cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în sistemul de testare. Pe parcursul testului, concentrațiile substanței chimice de testare sunt determinate la intervale regulate, după cum urmează: debitul diluantului și cel a soluției stoc toxice trebuie verificate, de preferat zilnic, însă de cel puțin două ori pe săptămână, iar aceste fluxuri nu trebuie să varieze cu mai mult de 10 % pe întreaga durată a testului Se recomandă măsurarea concentrațiilor efective ale substanței chimice de testare în toate vasele la începutul testului și, ulterior, săptămânal.

33. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Cu toate acestea, în cazul în care concentrația substanței de testare în soluție a fost menținută în mod satisfăcător pe tot parcursul testului într-un interval de ±20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi fundamentate fie pe valorile nominale, fie pe cele măsurate.

34. Poate fi necesară filtrarea probelor (de exemplu, cu ajutorul unui filtru cu pori de 0,45 μm) sau centrifugarea lor. Dacă este necesar, procedura recomandată este centrifugarea. Cu toate acestea, dacă materialul de testare nu se adsoarbe în filtre, filtrarea este acceptabilă în egală măsură.

35. Pe parcursul testului, oxigenul dizolvat, temperatura și pH-ul trebuie măsurate în toate vasele de testare cel puțin o dată pe săptămână. Duritatea totală și alcalinitatea trebuie măsurate cel puțin o dată pe săptămână în toate vasele de control și în vasul cu cea mai înaltă concentrație. Este de preferat ca temperatura să fie monitorizată continuu cel puțin într-unul din bazine.

Observații

36. O serie de aspecte generale (de exemplu, supraviețuirea) și răspunsuri biologice (de exemplu, nivelurile de vitelogenină) sunt evaluate pe parcursul testului sau la încheierea acestuia. Este necesară monitorizarea cantitativă zilnică a fecundității. Măsurarea și evaluarea acestor puncte finale și utilitatea lor sunt descrise în continuare.

Supraviețuirea

37. Peștii trebuie examinați zilnic pe parcursul perioadei de testare și orice caz de deces trebuie înregistrat, iar peștii morți trebuie îndepărtați cât mai rapid posibil. Peștii morți nu trebuie înlocuiți în vasele de control sau în vasele de tratament. Sexul peștilor morți în timpul testului trebuie stabilit printr-o evaluare macroscopică a gonadelor.

▼M7

Comportament și aspect

38. Trebuie notat orice comportament anormal (în raport cu grupul de control); acesta ar putea include semne ale toxicității generale, inclusiv hiperventilație, înotul necoordonat, pierderea echilibrului, imobilitate sau hrănire atipice. De asemenea, trebuie observate anomaliile externe (precum hemoragia, modificările de culoare). Astfel de semne de toxicitate trebuie luate în considerare cu atenție în timpul interpretării datelor, întrucât acestea pot indica concentrații la care biomarkerii activității endocrine nu sunt fiabili. Observațiile referitoare la comportament pot furniza, de asemenea, informații calitative utile pentru a sta la baza unor posibile viitoare cerințe în materie de testare a peștilor. De exemplu, a fost observată o agresivitate teritorială la masculii normali sau la femele masculinizate de *Pimephales promelas* prin expunere la androgenice; în cazul peștelui-zebră, comportamentul caracteristic de împerechere și de eliberare de gameți după răsăritul soarelui este redus sau afectat de expunerea la estrogenice sau la antiandrogenice.

39. Deoarece anumite elemente legate de aspect (în primul rând culoarea) se pot modifica rapid în timpul manipulării, este important să se realizeze observații calitative înainte de eliminarea animalelor din sistemul de testare. Experiența de până în prezent în ceea ce privește *Pimephales promelas* sugerează că anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce inițial modificări ale următoarelor caracteristici exterioare: culoarea corpului (deschisă sau închisă), modele de colorație (prezența unor dungi verticale) și forma corpului (regiunea capului și regiunea pectorală). Prin urmare, trebuie realizate observații privind aspectul fizic al peștilor pe parcursul testului și la încheierea studiului.

Fecunditate

40. Trebuie înregistrate observații cantitative zilnice legate de eliberarea de gameți per duplicat. Producția de ouă trebuie să fie înregistrată ca numărul de ouă/femelă supraviețuitoare/zi per duplicat. Ouăle vor fi îndepărtate zilnic din camerele de testare. Substraturile de reproducere trebuie amplasate în camera de testare în cazul *Pimephales promelas* și în cazul peștelui-zebră pentru a permite peștilor să elibereze gameți în condiții normale. Apendicele 4 oferă detalii suplimentare privind substraturile de reproducere recomandate pentru peștele-zebră (apendicele 4a) și pentru Pimephales promelas (anexa 4b). Nu se consideră necesar să se prevadă un substrat de reproducere în cazul *Oryzias latipes.*

Eutanasierea peștilor

41. În ziua 21, și anume la încheierea perioadei de expunere, peștii trebuie eutanasiați cu ajutorul unor cantități corespunzătoare de tricaină (metan sulfonat de tricaină, metacaină, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l tamponată cu 300 mg/l NaHCO3 (bicarbonat de sodiu, CAS 144-55-8) pentru a reduce iritația mucoaselor; apoi sunt prelevate probe de sânge sau de țesut pentru determinarea vitelogeninei, conform explicațiilor din secțiunea privind vitelogenina.

Observarea caracteristicilor sexuale secundare

42. Anumite substanțe chimice care acționează la nivel endocrin pot induce modificări ale caracteristicilor sexuale secundare specializate (numărul de tuberculi nupțiali la masculul *Pimephales promelas*, procesele papilare la masculul de *Oryzias latipes*). În special, substanțele chimice cu anumite moduri de acțiune pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la animalele de sex opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi trenbolonul, metiltestosteronul și dihidrotestosteronul pot cauza dezvoltarea de tuberculi nupțiali proeminenți la femelele de *Pimephales promelas* sau dezvoltarea de procese papilare la femelele de *Oryzias latipes* (11, 20, 21). De asemenea, s-a raportat faptul că agoniștii receptorilor estrogenici pot reduce numărul de tuberculi nupțiali și dimensiunea depozitelor subcutanate dorsale ale masculilor adulți de *Pimephales promelas* (26, 27). Aceste observații morfologice macroscopice pot furniza informații calitative și cantitative utile pentru a sta la baza unor posibile

▼M7

viitoare cerințe privind testarea peștilor. Numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali ai *Pimephales promelas* și ale proceselor papilare ale *Oryzias latipes* pot fi cuantificate direct sau, mai practic, în eșantioanele conservate. Procedurile recomandate pentru evaluarea caracteristicilor sexuale secundare la *Pimephales promelas* și la *Oryzias latipes* sunt disponibile în apendicele 5A și, respectiv, apendicele 5B.

Vitelogenina (VTG)

43. Se prelevează sânge din artera/vena caudală cu un tub capilar microhematocrit heparinizat sau, alternativ, printr-o puncție cardiacă cu ajutorul unei seringi. În funcție de mărimea peștelui, volumul de sânge prelevat se încadrează în general între 5 și 60 µl pe individ în cazul *Pimephales promelas* și între 5 și 15 µl pe individ în cazul peștelui-zebră. Plasma este separată de sânge prin centrifugare și este depozitată cu inhibitori de protează la o temperatură de – 80 °C până când este analizată pentru a măsura vitelogenina. Alternativ, în cazul *Oryzias latipes* se va utiliza ficatul, iar în cazul peștelui-zebră, omogenatul de cap/coadă poate fi utilizat ca țesut-sursă pentru determinarea vitelogeninei (apendicele 6). Măsurarea VTG trebuie să se bazeze pe o metodă ELISA omoloagă validată, utilizând un standard omolog de VTG și anticorpi omologi. Se recomandă utilizarea unei metode capabile să detecteze nivelurile de VTG de ordinul a câteva ng/ml de plasmă (sau ng/mg de țesut), care reprezintă nivelul de fond la masculii neexpuși.

44. Controlul calității măsurării vitelogeninei se va realiza prin utilizarea de soluții standard, de probe-martor și cel puțin de analize duplicat. Pentru fiecare metodă ELISA, trebuie efectuat un test al efectului matricial (efectul de diluție a probei) pentru a determina factorul de diluție minimă a probei. Fiecare placă ELISA utilizată pentru testele VTG trebuie să includă următoarele probe de control al calității: cel puțin 6 soluții standard de calibrare care acoperă intervalul de concentrații de vitelogenină preconizate și cel puțin o probă-martor de testare de legare nespecifică (analizată în duplicat). Absorbanța acestor probe-martor trebuie să fie mai mică de 5 % din absorbanța maximă a soluțiilor standard de calibrare. Vor fi analizate cel puțin două alicote (duplicate godeu) din fiecare diluție a probei. Duplicatele godeu care diferă cu un procent mai mare de 20 % trebuie reanalizate.

45. Coeficientul de corelație (R^2) al curbelor de calibrare trebuie să fie mai mare de 0,99. Cu toate acestea, o corelație mare nu este suficientă pentru a garanta o predicție adecvată a concentrației pentru toate intervalele. Pe lângă o corelație suficient de mare pentru curba de calibrare, concentrația fiecărei soluții standard, calculată pornind de la curba de calibrare, trebuie să se încadreze între 70 % și 120 % din concentrația sa nominală. În cazul în care concentrațiile nominale tind să se îndepărteze de linia de regresie a calibrării (de exemplu, spre concentrații mai mici), poate fi necesară împărțirea curbei de calibrare în intervale de concentrații mici și mari sau utilizarea unui model neliniar pentru a ajusta în mod adecvat datele privind absorbanța. În cazul împărțirii curbei, ambele segmente de linie trebuie să aibă valoarea $R^2 > 0,99$.

46. Limita de detecție (LOD) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice, iar limita de cuantificare (LOQ) este definită ca fiind cea mai mică concentrație a soluției standard analitice înmulțită cu cel mai mic factor de diluție.

47. În fiecare zi în care sunt efectuate măsurări ale vitelogeninei se va analiza o probă fortificată utilizând un standard de referință intertest (apendicele 7). Raportul dintre concentrația preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

Evaluarea histopatologică a gonadelor

48. Autoritățile de reglementare pot solicita efectuarea unei analize histopatologice a gonadelor în vederea studierii organului țintă pe axul HPG în urma expunerii la substanța chimică. În acest sens, gonadele sunt fixate fie în întregime, fie disecate. În cazul în care examenul histopatologic este

▼M7

necesar, se vor căuta anumite răspunsuri cu caracter endocrin în evaluarea activității endocrine a substanței chimice testate. Aceste răspunsuri de diagnosticare includ, în principal, prezența oocitelor testiculare, hiperplazia celulei Leydig, spermatogonie mărită și hiperplazia zonei perifoliculare. Alte leziuni ale gonadei precum atrezia oocitelor, degenerarea testiculară și schimbările de stadiu pot avea la bază cauze diverse. Documentul de orientare privind examinarea histopatologică a gonadelor de pește precizează procedurile care vor fi utilizate la disecția, fixarea, secționarea și examinarea histopatologică a gonadelor (22).

DATE ȘI RAPORTARE

Evaluarea răspunsurilor biomarkerilor prin analiza variației (ANOVA)

49. Pentru a identifica activitatea potențială a unei substanțe chimice, răspunsurile grupurilor tratate sunt comparate cu cele ale grupurilor de control utilizând analiza variației (ANOVA). În cazul în care se utilizează un solvent de control, trebuie efectuat un test statistic corespunzător între apa de diluție și solventul de control pentru fiecare parametru final studiat. Orientări cu privire la interpretarea datelor referitoare la apa de diluție și solventul de control în cadrul analizei statistice ulterioare sunt disponibile în OCDE, 2006c (28). Toate datele privind răspunsurile biologice trebuie analizate și raportate separat per sex. Dacă nu sunt îndeplinite ipotezele necesare pentru metodele parametrice — distribuție anormală (de exemplu, testul Shapiro-Wilk) sau variață eterogenă (testul Barlett sau testul Levene) — trebuie luată în considerare transformarea datelor în scopul omogenizării variațelor înainte de efectuarea analizei variației sau efectuarea unei analize ponderate a variației. Testul Dunnett (parametric) care permite comparații multiple pe perechi sau testul Mann-Whitney cu ajustarea Bonferroni (neparametrică) poate fi utilizat pentru un raport doză-răspuns nemonoton. Pot fi utilizate alte teste statistice (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra sau testul Williams) în cazul în care raportul doză-răspuns este aproximativ monoton. În apendicele 8 este furnizată o diagramă statistică pentru a contribui la luarea unei decizii cu privire la alegerea testului statistic cel mai adecvat pentru a fi utilizat. Informații suplimentare pot fi obținute, de asemenea, din Documentul OCDE privind metodele actuale de analiză statistică a datelor de ecotoxicitate (28).

Raportarea rezultatelor testului

50. Datele studiului trebuie să includă:

Facilitatea de testare:

— Personalul responsabil și responsabilitățile sale în cadrul studiului

— Fiecare laborator trebuie să își fi demonstrat competența prin utilizarea unei game de substanțe chimice reprezentative

Substanța chimică de testare:

— Caracterizarea substanței chimice de testare

— Natura fizică și proprietățile fizico-chimice relevante

— Metoda și frecvența preparării concentrațiilor de testare

— Informații privind stabilitatea și biodegradabilitatea

Solventul:

— Caracterizarea solventului (natura, concentrația utilizată)

— Justificarea alegerii solventului (în cazul în care acesta nu este apa)

▼M7

Animalele de testare:

— Specia și subspecia

— Furnizorul și unitatea specifică a furnizorului

— Vârsta peștilor la începutul testului și stadiul de reproducere/de eliberare a gameților

— Detalii cu privire la procedura de aclimatizare a animalelor

— Greutatea corporală a peștilor la începutul expunerii (dintr-un subeșantion din stocul de pești)

Condiții de testare:

— Procedura de testare utilizată (tipul testului, rata de încărcare, densitatea populației etc.);

— Metoda de preparare a soluțiilor stoc și debitul;

— Concentrațiile nominale de testare, concentrațiile soluțiilor de testare testate săptămânal și metoda analitică utilizată, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard în vasele de testare și dovada faptului că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței chimice de testare în soluție reală;

— Caracteristicile apei de diluție (incluzând pH, duritate, alcalinitate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelurile de clor rezidual, carbonul organic total, solidele în suspensie și orice altă măsurătoare efectuată)

— Calitatea apei din vasele de testare: pH, duritate, temperatură și concentrația oxigenului dizolvat;

— Informații detaliate privind hrănirea [de exemplu, tipul de aliment (alimente), sursa, cantitatea furnizată, frecvența și analizele privind contaminanți relevanți, dacă sunt disponibile (de exemplu, BPC, HAP și pesticide organoclorurate)].

Rezultate

— Dovada că soluțiile de control îndeplinesc criteriile de acceptare a testului;

— Datele privind mortalitățile pentru fiecare nivel de concentrație de testare și pentru fiecare control;

— Tehnicile de analiză statistică utilizate, prelucrarea datelor și justificarea tehnicilor utilizate;

— Datele privind observațiile biologice de morfologie macroscopică, inclusiv caracteristicile sexuale secundare, producția de ouă și vitelogenina;

— Rezultatele analizelor datelor, de preferință sub formă de tabele și de grafice;

— Incidența oricărei reacții neobișnuite a peștilor și a oricărui efect vizibil provocat de substanța chimică de testare

▼M7

ORIENTĂRI PENTRU INTERPRETAREA ȘI ACCEPTAREA REZULTATELOR TESTULUI

51. Această secțiune include unele considerații care trebuie avute în vedere pentru interpretarea rezultatelor testului în ceea ce privește diferiții parametri măsurați. Rezultatele trebuie interpretate cu precauție în cazul în care substanța chimică de testare pare a cauza semne evidente de toxicitate sau a afecta starea generală a animalului testat.

52. La stabilirea intervalului de concentrații de testare, nu trebuie să se depășească concentrația maximă tolerată pentru a permite o interpretare corespunzătoare a datelor. Este important să se aplice cel puțin un tratament care să nu prezinte semne ale unor efecte toxice. Semnele de boală și semnele unor efecte toxice trebuie evaluate și raportate în detaliu. De exemplu, producția de VTG la femele poate fi afectată, de asemenea, de toxicitatea generală și de modurile de acțiune toxice non-endocrine, de exemplu hepatotoxicitate. Cu toate acestea, interpretarea efectelor poate fi consolidată prin alte niveluri de tratament care nu sunt afectate de toxicitatea sistemică.

53. Există unele aspecte care trebuie luate în considerare pentru acceptarea rezultatelor testului. Cu titlu orientativ, nivelurile de VTG la grupele de control de masculi și de femele trebuie să fie distincte și separate de aproximativ trei ordine de mărime în cazul *Pimephales promelas* și al peștelui-zebră și de aproximativ un ordin de mărime în cazul *Oryzias latipes*. Exemple ale intervalului de valori întâlnite la grupele de control și la cele tratate sunt disponibile în rapoartele de validare (1, 2, 3, 4). Valori mari ale VTG la masculii din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta agoniștii estrogenici slabi. Valori mici ale VTG la femelele din grupele de control ar putea compromite performanța testului și capacitatea acestuia de a detecta inhibitorii aromatazei și antagoniștii estrogenici. Studiile de validare au fost utilizate pentru a elabora orientarea respectivă.

54. În ceea ce privește cuantificarea producției de ouă, aceasta este supusă unor variații importante [coeficientul de variație (CV) poate varia de la 20 la 60 %] care afectează capacitatea testului de a detecta o scădere semnificativă a producției de ouă mai mică decât 70 % pe măsură ce valoarea CV se apropie de 50 % sau mai mult. Atunci când CV este limitat la valori mai scăzute (în jur de 20-30 %), testul va avea o putere acceptabilă (80 %) pentru a detecta o scădere cu 40-50 % a producției de ouă. Conceperea testului utilizat pentru *Pimephales promelas*, care include patru duplicate pentru fiecare nivel de tratament, ar trebui să acorde mai multă putere parametrului de fecunditate, în comparație cu un test cu doar două duplicate.

55. În cazul în care un laborator nu a mai realizat testul anterior sau au fost efectuate modificări substanțiale (de exemplu, schimbarea subspeciei sau a furnizorului de pești), se recomandă efectuarea unui studiu de competență tehnică. Se recomandă utilizarea unor substanțe chimice care prezintă o gamă de moduri de acțiune sau de impacturi asupra unor parametri studiați. Practic, fiecare laborator este încurajat să își elaboreze propriile date istorice de control pentru masculi și femele și să efectueze teste cu o substanță chimică de control pozitivă pentru activitatea estrogenică (de exemplu, 17β-estradiol la 100 ng/l sau un agonist slab cunoscut) având ca rezultat creșterea VTG la masculi, cu o substanță de control pozitiv în vederea inhibării aromatazei (de exemplu, fadrozol sau procloraz la 300 µg/l) având ca rezultat scăderea VTG la femele și cu o substanță chimică de control pozitiv pentru activitatea androgenică (de exemplu 17β-trenbolonul la 5 µg/l) având ca rezultat inducerea caracteristicilor sexuale secundare la femelele de *Pimephales promelas* și de *Oryzias latipes*. Toate aceste date pot fi comparate cu datele disponibile din studiile de validare (1, 2, 3) pentru a garanta competența laboratorului.

56. În general, măsurătorile vitelogeninei trebuie considerate pozitive în cazul unei creșteri semnificative statistic a VTG la masculi ($p < 0.05$) sau în cazul unei scădere semnificative statistic la femele ($P < 0.05$) cel puțin la doza

▼M7

maximă testată în comparație cu grupul de control și în absența semnelor de toxicitate generală. Un rezultat pozitiv este confirmat suplimentar prin demonstrarea unei relații plauzibile din punct de vedere biologic între doză și curba răspunsurilor. Astfel cum s-a menționat anterior, scăderea vitelogeninei poate să nu fie în totalitate de origine endocrină; cu toate acestea, un rezultat pozitiv trebuie să fie interpretat, în general, ca o dovadă a activității endocrine *in vivo* și trebuie să genereze în mod normal acțiuni pentru clarificări suplimentare.

57. Evaluarea histopatologică a gonadelor poate fi solicitată de autoritățile de reglementare pentru a determina capacitatea de reproducere a animalelor testate și pentru a permite realizarea unei evaluări probatorii a rezultatelor testului. Efectuarea examinării histopatologice a gonadelor se poate dovedi de prisos în cazul unor valori pozitive ale VTG sau ale caracteristicilor sexuale secundare (și anume, creșterea sau scăderea VTG sau inducerea caracteristicilor sexuale secundare).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay.CEFIC LRI Project, Endocrine. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., et al. (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., et al. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F., et al. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., et al. (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Oryzias latipes (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Oryzias latipes. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, et al (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts", not „traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., et al. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Apendicele 1

ABREVIERI ŞI DEFINIŢII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

CV: coeficient de variație

ELISA: test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

Axul HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștelui per volum de apă.

CMT: concentrația maximă tolerată, reprezentând aproximativ 10 % din CL_{50} (concentrația letală)

Densitatea populației: numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Substanța chimică de testat: orice substanță sau amestec testat în cadrul acestei metode de testare.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

▼M7

Apendicele 2

CONDIȚII EXPERIMENTALE PENTRU TESTUL DE SCREENING ENDOCRIN LA PEȘTI

1. Specii recomandate	Pimephales promelas (*Pimephales promelas*)	Oryzias latipes (*Oryzias latipes*)	Peștele-zebră (*Danio rerio*)
2. Tip de test	În regim dinamic	În regim dinamic	În regim dinamic
3. Temperatura apei	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)	Becuri fluorescente (spectru larg)
5. Intensitatea luminii	10-20 µE/ m^2/s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)	10-20 µE/m^2/s, 540-1 000 lux, sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator	10-20 µE/ m^2/s, 540-1 000 lux, sau50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator)
6. Perioada de expunere la lumină (tranzițiile răsărit-apus sunt opționale, cu toate acestea nu sunt considerate necesare)	16 h de lumină, 8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric	12-16 h de lumină, 12-8 h de întuneric
7. Rata de încărcare	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Dimensiunea camerelor de testare	10 (minimum)	2 (minimum)	5 (minimum)
9. Volumul soluției de testare	8 (minimum)	1.5 (minimum)	4 (minimum)
10. Volumele soluțiilor de testare schimbate	Minimum 6/zi	Minimum 5/zi	Minimum 5/zi
11. Vârsta organismelor testate	A se vedea punctul 21.	A se vedea punctul 21.	A se vedea punctul 21.
12. Greutatea umedă aproximativă a peștilor adulți (g)	Femele: 1,5 ± 20 % masculi: 2,5 ± 20 %	Femele: 0,35 ± 20 % masculi: 0,35 ± 20 %	Femele: 0,65 ± 20 % masculi: 0,4 ± 20 %
13. Nr. de pești per vas de testare	6 (2 masculi și 4 femele)	6 (3 masculi și 3 femele)	10 (5 masculi și 5 femele)
14. Nr. de tratamente	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)	= 3 (plus controalele corespunzătoare)
15. Nr. de vase per tratament	4 minimum	4 minimum	2 minimum
16. Nr. de pești pentru fiecare concentrație testată	16 femele adulte și 8 masculi adulți (4 femele și 2 masculi în fiecare vas duplicat)	12 femele adulte și 12 masculi adulți (3 femele și 3 masculi în fiecare vas duplicat)	10 femele adulte și 10 masculi adulți (5 femele și 5 masculi în fiecare vas duplicat)
17. Regimul de hrănire	Adulți sau nauplius de Artemia de două sau de trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de Artemia de două sau trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate	Nauplius de Artemia de două sau trei ori pe zi (*ad libitum*), hrană disponibilă în comerț sau o combinație a celor menționate

▼M7

18. Aerarea	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer	Fără aerare, cu excepția cazului în care concentrația de oxigen dizolvat este sub 60 % din valoarea de saturație din aer
19. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată
20. Perioada de preexpunere	Perioadă recomandată de 7 14 zile	Perioadă recomandată de 714 zile	Perioadă recomandată de 714 zile
21. Durata expunerii la substanța chimică	21-d	21-d	21-d
22. Parametri biologici studiați	— supraviețuire — comportament — fecunditate — caracteristici sexuale secundare — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor	— supraviețuire — comportament — fecunditate — caracteristici sexuale secundare — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor	— supraviețuire — comportament — fecunditate — VTG — opțional examinare histopatologică a gonadelor
23. Criterii de acceptare a testului	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 25 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate menținute în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 25 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament	Oxigenul dizolvat ≥ 60 % din saturație; temperatura medie de 26 ± 2 °C; supraviețuire de 90 % la peștii de control; concentrații de testare măsurate în limita a 20 % din media valorilor măsurate pentru fiecare nivel de tratament

▼**M7**

Apendicele 3

ANUMITE CARACTERISTICI ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

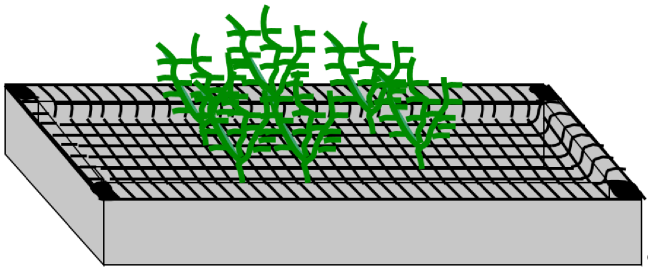
COMPONENTĂ	CONCENTRAȚII
Particule în suspensie	< 20mg/l
Carbon organic total	< 2mg/l
Amoniac neionizat	< 1μg/l
Clor rezidual	< 10μg/l
Total pesticide organofosforice	< 50ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	< 50ng/l
Total clor organic	< 25 ng/l

▼M7

Apendicele 4A

SUBSTRATUL DE REPRODUCERE PENTRU PEȘTELE-ZEBRĂ

Tavă de reproducere: tavă instrumentară în întregime din sticlă, cu dimensiuni de exemplu de 22 × 15 × 5,5 cm (L × l × î), acoperită cu o sită mobilă din oțel inoxidabil (orificii de 2 mm). Sita trebuie să acopere deschiderea tăvii instrumentare la un nivel situat mai jos decât marginea acesteia.



Substratul de reproducere se fixează pe sită. Se formează o structură în care pot pătrunde peștii. De exemplu, sunt adecvate plante de acvariu artificiale realizate din plastic de culoare verde (NB: trebuie luată în considerare posibila absorbție a substanței chimice de testare în materialul din plastic). Plasticul trebuie să fie curățat cu o cantitate suficientă de apă caldă pentru o perioadă suficientă de timp pentru a se asigura că nicio substanță chimică nu poate pătrunde în apa de testare. Dacă se utilizează materiale din sticlă, trebuie avut grijă ca peștii să nu se rănească sau să se înghesuie în timpul deplasărilor.

Distanța dintre tavă și pereții din sticlă trebuie să fie de cel puțin 3 cm pentru a se asigura că eliberarea gameților nu se realizează în afara tăvii. Ouăle depuse pe tavă cad printre ochiurile sitei și pot fi prelevate la 45-60 de minute după pornirea iluminării. Ouăle transparente nu sunt adezive și pot fi ușor numărate în condiții de iluminare transversală. Atunci când se utilizează cinci femele pentru fiecare vas, numărul de ouă este considerat mic dacă este de maximum 20 pe zi, mediu dacă este de maximum 100 și mare dacă este peste 100. Tava de reproducere trebuie îndepărtată, ouăle colectate, iar tava de reproducere reintrodusă în vasul de testare, fie seara la o oră cât mai târzie, fie dimineața foarte devreme. Perioada până la reintroducere nu trebuie să depășească o oră, întrucât, în caz contrar, semnalul substratului de reproducere poate induce împerecherea individuală și eliberarea gameților într-un moment neobișnuit. Dacă situația impune introducerea mai târzie a tăvii de reproducere, aceasta trebuie să se efectueze cu cel puțin 9 ore după pornirea iluminării. La această oră târzie din zi, eliberarea gameților nu mai este indusă.

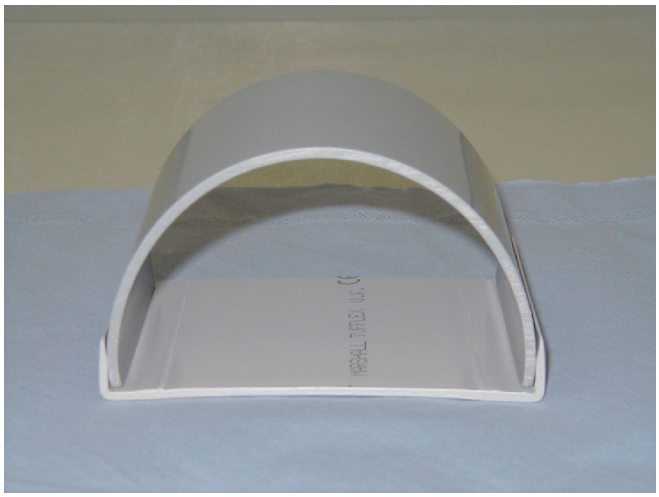
▼**M7**

Apendicele 4B

SUBSTRATUL DE REPRODUCERE PENTRU *PIMEPHALES PROMELAS*

Două sau trei plăci sau tăvi de reproducere din plastic/ceramică/sticlă sau oțel inoxidabil combinate sunt așezate în fiecare cameră de testare (de exemplu un jgheab semicircular de culoare gri cu o lungime de 80 mm, așezat pe o tavă cu margini ridicate cu o lungime de 130 mm) (a se vedea imaginea). S-a demonstrat că plăcile din PVC sau din ceramică tratate în mod corespunzător sunt adecvate pentru un substrat de reproducere (Thorpe et al, 2007).

Se recomandă ca plăcile să fie șlefuite pentru a îmbunătăți aderența. Tava trebuie să fie, de asemenea, prevăzută cu un ecran de protecție pentru a împiedica accesul peștilor la ouăle căzute, cu excepția cazului în care eficiența aderenței ouălor a fost demonstrată pentru substratul de reproducere utilizat.



Baza este concepută pentru a reține toate ouăle care nu aderă la suprafața plăcilor și care, în consecință, ar cădea pe fundul bazinului (sau ouăle depuse direct pe baza plană din plastic). Toate substraturile de reproducere trebuie curățate înainte de utilizare timp de cel puțin 12 ore în apă de diluție.

KL Thorpe, Benstead R, Hutchinson, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90-98.

▼M7

Apendicele 5A

EVALUAREA CARACTERISTICILOR SEXUALE SECUNDARE LA *PIMEPHALES PROMELAS* PENTRU DETECTAREA ANUMITOR SUBSTANȚE CHIMICE CARE ACȚIONEAZĂ LA NIVEL ENDOCRIN

Prezentare generală

În cazul adulților de *Pimephales promelas*, caracteristicile aspectului fizic potențial importante în cadrul testării perturbatorilor endocrini includ culoarea corpului (deschisă/închisă), modelele de colorație (prezența sau absența unor dungi verticale), forma corpului (forma capului și a regiunii pectorale, distensia abdomenului), precum și caracteristicile sexuale secundare specializate (numărul și dimensiunea tuberculilor nupțiali, dimensiunea depozitului subcutanat dorsal și ovipozitorul).

Tuberculii nupțiali sunt situați pe cap (depozit subcutanat dorsal) la masculii de *Pimephales promelas* activi din punct de vedere reproductiv și sunt dispuși de regulă simetric bilateral (Jensen *et al.* 2001). Femelele de control și masculii și femelele tinere nu dezvoltă tuberculi (Jensen et al. 2001). La masculi, numărul de tuberculi individuali situați în jurul ochilor și între nări este de maximum opt. Cei mai mulți și mai mari tuberculi sunt așezați sub forma a două șiruri paralele imediat sub nări și deasupra gurii. Numeroși pești au grupuri de tuberculi situați sub mandibulă; cei situați cel mai aproape de gură apar în general într-o singură pereche, în timp ce setul situat mai ventral se poate compune din până la patru tuberculi. Numărul efectiv de tuberculi este rareori mai mare de 30 (interval 18-28; Jensen *et al.* 2001). Tuberculii predominanți (din punct de vedere al numărului) sunt prezenți sub forma unei structuri singulare, relativ rotunde, cu înălțimea aproximativ echivalentă cu raza. Cei mai mulți masculi activi din punct de vedere reproductiv au, de asemenea, cel puțin câțiva tuberculi măriți și pronunțați astfel încât nu pot fi distinși ca structuri individuale.

Unele tipuri de substanțe chimice cu efect la nivel endocrin pot cauza apariția anormală a unor caracteristici sexuale secundare la sexul opus; de exemplu, agoniști ai receptorilor androgenici, cum ar fi 17α-metiltestosteronul sau 17β-trenbolonul, pot cauza apariția de tuberculi nupțiali la femelele de Pimephales promelas (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), în timp ce agoniști ai receptorilor estrogenici pot reduce numărul sau dimensiunea tuberculilor nupțiali la masculi (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al*. 2000).

În continuare, este prezentată o descriere a caracterizării tuberculilor nupțiali la *Pimephales promelas* pe baza procedurilor utilizate în cadrul laboratorului Agenției de Protecție a Mediului din SUA din Duluth, Minnesota. Produsele și/sau echipamentele specifice pot fi înlocuite cu materiale comparabile aflate la dispoziție.

Vizualizarea se realizează cel mai bine cu ajutorul unei lupe iluminate sau al unui microscop de disecție 3X iluminat. Peștele este observat din partea dorsală și cu partea anterioară înainte (capul spre observator).

— Se așază peștele într-o placă Petri mică (de exemplu, cu diametrul de 100 mm), cu partea anterioară înainte și cu partea ventrală în jos. Se reglează vizorul pentru a putea identifica tuberculii. Se rulează peștele ușor și încet de pe o parte pe alta pentru a identifica zonele cu tuberculi. Se numără și se clasifică tuberculii.

— Se repetă observația pe partea ventrală a capului după ce s-a așezat peștele în placa Petri cu partea dorsală anterioară înainte.

— Observațiile nu trebuie să dureze mai mult de 2 minute pentru fiecare pește.

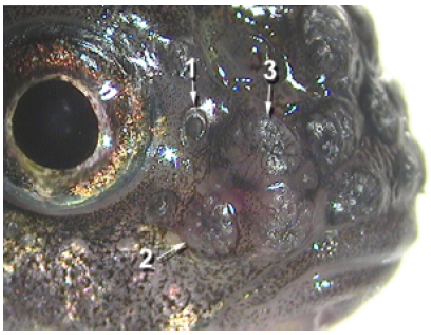
▼M7

Numărarea și clasificarea tuberculilor

Au fost identificate șase zone specifice pentru evaluarea prezenței și a dezvoltării de tuberculi la adulții de *Pimephales promelas*. A fost creat un model pentru a cartografia localizarea și cantitatea tuberculilor prezenți (a se vedea partea de încheiere a prezentului apendice). Numărul tuberculilor este înregistrat, iar dimensiunea lor poate fi clasificată cantitativ astfel: 0-absent, 1-prezent, 2-mărit și 3-pronunțat pentru fiecare organism (Fig. 1).

Categoria 0 – absența oricărui tubercul. Categoria 1 – tubercul prezent, identificat ca orice tubercul care are un singur punct a cărui înălțime este aproape echivalentă cu raza sa. Categoria 2 – tubercul mărit, identificat prin țesutul sub formă de asterisc, prezentând în mod obișnuit o bază radială mare cu șanțuri sau caneluri care pornesc din centru. Înălțimea tuberculului este adesea mai neregulată, însă uneori poate fi rotunjită. Categoria 3 – tubercul pronunțat, de regulă foarte mare și rotunjit cu o structură mai puțin definită. Uneori, acești tuberculi se grupează formând o singură masă de-a lungul unei zone sau a mai multor zone (B, C și D, descrise mai jos). Colorația și forma sunt similare celor din categoria 2, însă uneori sunt destul de greu de distins. Utilizarea acestui sistem de clasificare va conduce în general la un număr total de tuberculi < 50 la un mascul normal din grupul de control care posedă un număr de tuberculi cuprins între 18 și 20 (*Jensen et al.* 2001).

Figura 1



Numărul efectiv de tuberculi la unii pești poate fi mai mare decât cel indicat în casetele model pentru o anumită zonă de clasificare. În acest caz, cifrele suplimentare pot fi marcate în interior, la dreapta sau la stânga casetei. Prin urmare, nu este necesar ca modelul să afișeze o simetrie. O altă tehnică pentru cartografierea tuberculilor perechi sau grupați vertical de-a lungul planului orizontal al gurii ar putea consta în dubla marcare a două puncte de clasificare a tuberculilor într-o singură casetă.

Zonele cartografiate:

A — Tuberculii situați în jurul ochilor. Localizați dorsal spre ventral în jurul marginii anterioare a ochilor. De regulă multipli la masculii maturi din grupul de control, absenți la femelele din grupul de control, dispuși în general în perechi (câte unul lângă fiecare ochi) sau singuri la femelele expuse la androgeni.

B-Tuberculii situați între nări (porii canalelor senzoriale). De regulă dispuși în perechi la masculii din grupul de control la niveluri de dezvoltare mai mari (2-mărit sau 3- pronunțat). Absenți la femelele din grupul de control, însă uneori prezenți și dezvoltați la femelele expuse la androgeni.

C — Tuberculii situați imediat anterior nărilor, paralel cu gura. În general măriți sau pronunțați la masculii de control maturi. Prezenți sau măriți la masculii mai puțin dezvoltați sau la femelele tratate cu androgeni.

▼M7

D – Tuberculi situați paralel de-a lungul liniei gurii. În general clasificați ca dezvoltați la masculii din grupul de control. Absenți la femelele din grupul de control, însă prezenți la femelele expuse la androgeni.

E – Tuberculii situaşi pe mandibulă, aproape de gură, de obicei de mici dimensiuni şi în general dispuşi în perechi. Variabili la masculii din grupul de control sau la cei trataţi şi la femelele tratate.

F – Tuberculii situați ventral față de E. De regulă de mici dimensiuni şi dispuşi în perechi. Prezenți la masculii din grupul de control şi la femelele expuse la androgeni.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas)*. Environ Chem Toxicol 20: 1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:10311038.

Model de tuberculi:

ID_____

Dată_____

Scor Total_____

Clasificare numerică

1-prezent

2-mărit

3-pronunțat

	O	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**						
	B	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**						
	C	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**
	D	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**
		E	**X 1**	**X 1**							
	F	**X 1**	**X 1**	**X 1**	**X 1**						

▼M7

Apendicele 5B

EVALUAREA CARACTERISTICILOR SEXUALE SECUNDARE LA *ORYZIAS LATIPES* PENTRU DETECTAREA ANUMITOR SUBSTANȚE CHIMICE CARE ACȚIONEAZĂ LA NIVEL ENDOCRIN

Mai jos este prezentată o descriere a măsurării proceselor papilare ([1]), care sunt caracteristici sexuale secundare la *Oryzias latipes*.

(1) După excizia ficatului (apendicele 6), carcasa este așezată într-un tub conic care conține aproximativ 10 ml de formol neutru 10 % tamponat (cu capul în sus și cu coada în jos). În cazul în care gonada este fixată într-o altă soluție decât formol neutru 10 % tamponat, se realizează cu ajutorul unei lame tăietoare o incizie transversală în carcasă între regiunea anterioară a înotătoarei anale și anus, având grijă să nu se lezeze gonoporul și gonada însăși (Figura 3) Se introduce capul peștelui în soluția fixatoare pentru a conserva gonadele, iar coada peștelui în formol neutru tamponat 10 % conform descrierii de mai sus.

(2) După ce se introduce corpul peștelui în formol neutru tamponat 10 %, se prinde regiunea anterioară a înotătoarei anale cu ajutorul unei pensete și se pliază timp de 30 de secunde pentru a menține deschisă înotătoarea anală. Prinzând înotătoarea anală cu ajutorul unei pensete, se prind câteva nervuri ale înotătoarei din regiunea anterioară cu grijă să nu se zgârie procesele papilare.

(3) După menținerea deschisă a înotătoarei anale timp de aproximativ 30 de secunde, se introduce corpul peștelui în formol neutru 10 % tamponat la temperatura camerei și se lasă astfel până la măsurarea proceselor papilare (măsurarea trebuie efectuată după fixare timp de cel puțin 24 de ore).

Măsurare

(1) După fixarea corpului peștelui în formol neutru 10 % tamponat timp de cel puțin 24 de ore, se scoate carcasa peștelui din tubul conic și se șterge formolul cu hârtie de filtru (sau un șervet de hârtie).

(2) Se așează peștele cu abdomenul în sus. Se taie apoi cu grijă înotătoarea anală cu ajutorul unei foarfeci mici de disecție (este de preferat să se taie înotătoarea anală cu puțin pterigiofor).

(3) Se prinde cu ajutorul unei pensete zona anterioară a înotătoarei anale excizate și se așază pe o lamelă din sticlă cu câteva picături de apă. Se acoperă apoi înotătoarea anală cu o altă lamelă din sticlă. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria procesele papilare în momentul prinderii înotătoarei anale cu penseta.

(4) Se determină numărul de plăci comune care prezintă procese papilare cu ajutorul unui contor sub un microscop biologic (microscop drept sau microscop inversat). Procesele papilare sunt recunoscute atunci când o mică formațiune de procese este vizibilă pe marginea posterioară a plăcii comune. Se notează pe foaia de lucru numărul de plăci comune care prezintă procese papilare pentru fiecare nervură a înotătoarei (de exemplu, prima nervură: 0, a doua nervură: 10, a treia nervură: 12 etc.) și se notează

([1]) Procesele papilare apar în mod normal numai la masculii adulți și sunt situate pe nervurile înotătoarei, pornind de la cea de a doua până la cea de a șaptea sau a opta de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale (Figurile 1 și 2). Cu toate acestea, procesele papilare apar rareori pe prima nervură de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale. Această procedură de operare standard (POS) cuprinde măsurarea proceselor de pe prima nervură a înotătoarei (numărul nervurilor este calculat în cadrul acestei POS pornind de la extremitatea posterioară a înotătoarei anale)

▼M7

suma acestor numere în foaia Excel pentru fiecare pește în parte. Dacă este necesar, se fotografiază înotătoarea anală și se determină pe fotografie numărul de plăci comune care prezintă procese papilare.

(5) După măsurare, se introduce înotătoarea anală în tubul conic descris la punctul (1) și se depozitează.

Figura 1

Diagramă care ilustrează diferența de formă și de dimensiune a înotătoarei anale între sexe. A, mascul; B, femelă. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

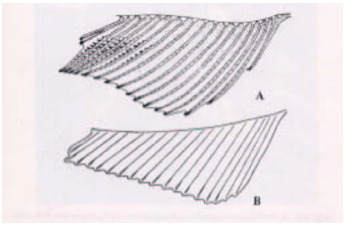


Figura 2

A, Procese papilare pe plăcile comune ale înotătoarei anale. J.P., placă comună; A.S., spațiu axial; P., proces. B, Extremitatea distală a radiei. Actinotrichiile (Act.) sunt situate la vârf. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

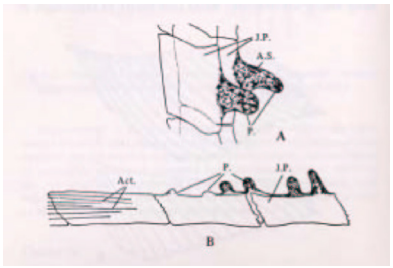
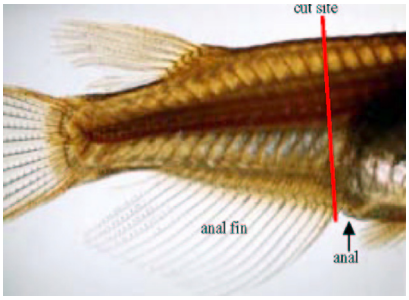


Figura 3

Fotografia unui corp de pește care ilustrează locul inciziei atunci când gonada este fixată într-o altă soluție de fixare decât formol neutru 10 % tamponat. În acest caz, corpul restant va fi tăiat între zona anterioară a înotătoarei anale și anus cu ajutorul unei lame (linia roșie), iar capul peștelui va fi introdus în soluția de fixare pentru gonade și partea corpului dinspre coadă va fi introdusă în formol neutru 10 % tamponat.



▼M7

Apendicele 6

PROCEDURI RECOMANDATE DE PRELEVARE A PROBELOR PENTRU ANALIZA VITELOGENINEI

Se procedează cu grijă pentru a evita contaminarea încrucișată între probele VTG ale masculilor și femelelor.

Procedura 1A: ***Pimephales promelas*****, prelevare de sânge din vena/artera caudală**

După anesteziere, pedunculul caudal este parțial secționat cu o lamă de bisturiu și se recoltează sânge din vena/artera caudală cu un tub capilar heparinizat micro-hematocrit. După prelevarea sângelui, plasma este separată rapid prin centrifugare timp de 3 minute la 15 000 g (sau, alternativ, timp de 10 minute la 15 000 *g* la o temperatură de 4 °C). Dacă se dorește, procentul de hematocrit poate fi determinat în urma centrifugării. Plasma este extrasă apoi din tubul microhematocrit și depozitată într-un tub de centrifugare cu 0,13 unități de aprotinină (un inhibitor de protează) la -80°C până va fi posibilă determinarea vitelogeninei. În funcție de dimensiunea peștilor *Pimephales promelas* (care depinde de sex), volumele de plasmă care pot fi prelevate sunt cuprinse între 5 și 60 microlitri pentru fiecare pește (Jensen *et al.* 2001).

Procedura 1B: ***Pimephales promelas*****, prelevare de sânge din inimă**

Alternativ, sângele poate fi prelevat printr-o puncție cardiacă realizată cu ajutorul unei seringi heparinizate (1 000 de unități de heparină/ml). Sângele este transferat în tuburi Eppendorf (ținute pe gheață) și apoi centrifugat (5 minute, 7 000 *g*, la temperatura camerei). Plasma trebuie transferată în tuburi Eppendorf curate (în alicote, dacă volumul de plasmă permite acest lucru) și congelată rapid la – 80 °C până ce este analizată (Panter *et al*., 1998).

Procedura 2A: ***Oryzias latipes*****, excizia ficatului**

Extragerea peștilor de testare din camera de testare

(1) Peștii pentru testare trebuie extrași din camera de testare cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni. Se procedează cu grijă pentru a nu scăpa peștii de testare în alte camere de testare.

(2) În principiu, peștii de testare trebuie scoși în următoarea ordine: din vasul de control, vasul de control cu solvent (dacă este cazul), vasul cu cea mai mică concentrație, vasul cu concentrația medie, vasul cu cea mai mare concentrație și vasul de control pozitiv. În plus, trebuie extrași toți peștii masculi dintr-o cameră de testare înainte de extragerea femelelor rămase.

(3) Sexul fiecărui pește pentru testare este identificat pe baza caracteristicilor sexuale secundare externe (de exemplu, forma înotătoarei anale).

(4) Se așază peștii pentru testare într-un container de transport și se transportă la stația de lucru pentru excizia ficatului. Se verifică etichetele camerei de testare și containerul de transport pentru precizie și pentru a confirma faptul că numărul peștilor scoși din camera de testare și numărul peștilor rămași în camera de testare sunt conforme celor preconizate.

(5) În cazul în care sexul nu poate fi stabilit pe baza aspectului exterior al peștelui, se îndepărtează toți peștii din incinta experimentală. În acest caz, sexul este identificat prin observarea gonadei sau a caracteristicilor sexuale secundare cu ajutorul unui microscop stereoscopic.

Excizia ficatului

(1) Se transferă peștii pentru testare din containerul de transport în soluția anestezică cu ajutorul unui minciog de mici dimensiuni.

▼M7

(2) După anestezierea peștilor pentru testare, aceștia sunt transferați pe o hârtie de filtru (sau pe un șervet de hârtie) cu ajutorul unei pensete (obișnuite) La prinderea peștilor pentru testare, se aplică brațele pensetei de o parte și de alta a capului pentru a evita ruperea cozii.

(3) Se șterge apa de pe suprafața peștilor pentru testare cu o hârtie de filtru (sau cu un șervet de hârtie).

(4) Se așază peștele cu abdomenul în sus. Se efectuează apoi o mică incizie transversală între zona ventrală a gâtului și zona de mijloc a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci de disecție.

(5) Se introduce foarfeca de disecție în mica incizie și se efectuează o incizie de-a lungul liniei mediane a abdomenului, de la un punct caudal la mantaua branhială până la partea craniană a anusului. Se procedează cu grijă pentru a nu introduce foarfeca de disecție prea adânc evitându-se astfel distrugerea ficatului și a gonadei.

(6) Se efectuează următoarele operațiuni la un microscop stereoscopic.

(7) Se așază peștele pentru testare cu abdomenul în sus pe un șervet de hârtie (se află la dispoziție, de asemenea, o placă Petri din sticlă sau o lamelă din sticlă).

(8) Se îndepărtează pereții cavității abdominale cu ajutorul unei pensete de precizie și se exteriorizează organele interne. Dacă este necesar, organele interne pot fi exteriorizate, de asemenea, prin înlăturarea unei părți a peretelui cavității abdominale.

(9) Se expune porțiunea care leagă ficatul de vezica biliară cu ajutorul unei alte pensete de precizie. Se prinde apoi canalul biliar și se excizează vezicula biliară. Se procedează cu grijă pentru a nu leza vezicula biliară.

(10) Se prinde esofagul și se separă prin excizare tractul gastrointestinal de ficat în același mod. Se procedează cu grijă pentru a nu vărsa conținutul tractului gastrointestinal. Se separă prin excizare tractul gastrointestinal caudal de anus și se îndepărtează tractul din cavitatea abdominală.

(11) Se taie masa de grăsime și alte țesuturi de la periferia ficatului. Se procedează cu grijă pentru a nu zgâria ficatul.

(12) Se prinde zona portală hepatică cu ajutorul pensetei de precizie și se extrage ficatul din cavitatea abdominală.

(13) Se așază ficatul pe o lamelă din sticlă. Cu ajutorul pensetei de precizie, se îndepărtează grăsimea și alte țesuturi (de exemplu, mucoasă abdominală), dacă este necesar, de pe suprafața ficatului.

(14) Se cântărește ficatul cu ajutorul unei balanțe analitice electronice, utilizând ca și contragreutate un microtub de 1,5 ml. Se înregistrează valoarea pe fișa de lucru (citire: 0,1 mg). Se confirmă informațiile de identificare pe eticheta microtubului.

(15) Se închide capacul microtubului care conține ficatul. Se depozitează într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).

(16) După excizia unui ficat, se curăță instrumentele de disecție sau se înlocuiesc cu unele curate.

▼M7

(17) Se excizează ficații de la toți peștii din containerul de transport conform descrierii de mai sus.

(18) După excizarea ficaților de la toți peștii din containerul de transport (și anume, toți masculii sau toate femelele dintr-o cameră de testare), se așează toate eșantioanele de ficat pe un stativ pentru tuburi prevăzut cu o etichetă de identificare și se depozitează într-un congelator. Atunci când ficații sunt donați pentru pretratament la scurt timp după excizie, eșantioanele sunt transportate la stația de lucru următoare într-un stativ pentru răcire (sau stativ cu gheață).

După excizia ficatului, carcasa peștelui este disponibilă pentru histologia gonadelor și măsurarea caracteristicilor sexuale secundare.

Model

Se depozitează eșantioanele de ficat prelevate de la peștii de testare la ≤ – 70 °C în cazul în care nu sunt utilizate pentru pretratament imediat după excizie.

Figura 1

Se efectuează o incizie în partea anterioară a înotătoarelor pectorale cu ajutorul unei foarfeci.

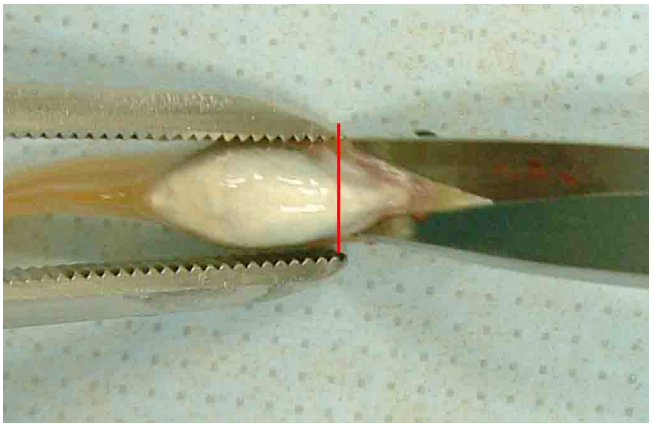
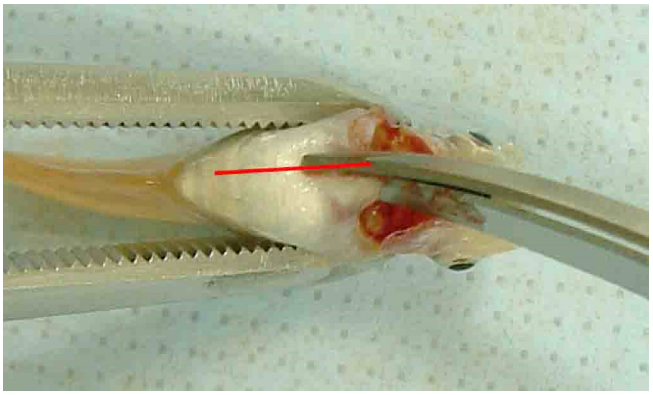


Figura 2

Se efectuează o incizie pe linia mediană a abdomenului cu ajutorul unei foarfeci spre un punct situat la aproximativ 2 mm cranial față de anus.



▼M7

Figura 3

Pereții abdominali sunt îndepărtați cu ajutorul unui forceps pentru a expune ficatul și celelalte organe interne.

(Alternativ, pereții abdominali pot fi fixați lateral cu ace).

Săgețile indică ficatul.

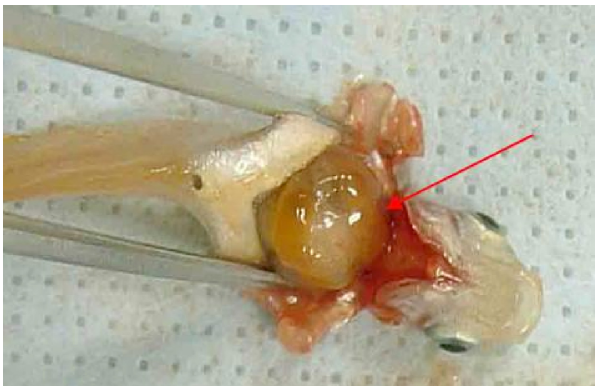


Figura 4

Ficatul este disecat și excizat cu ajutorul unui forceps.

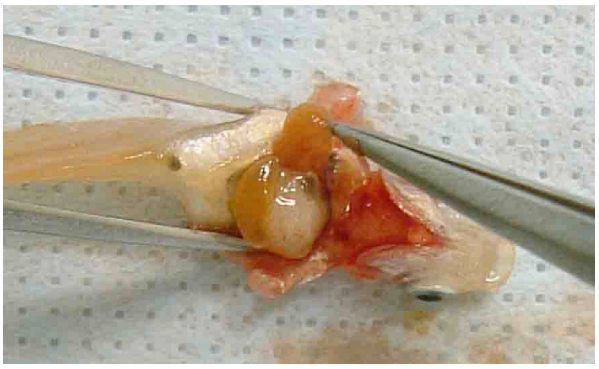
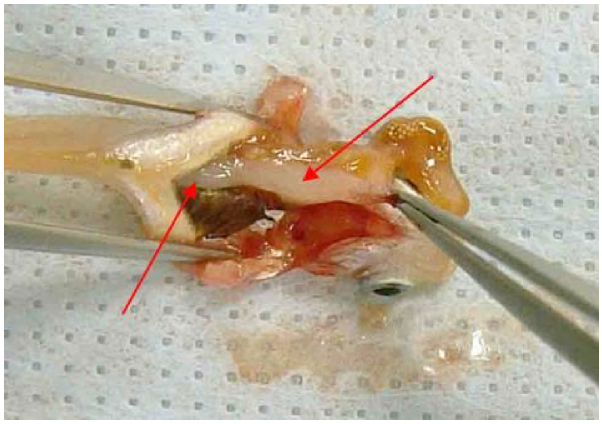


Figura 5

Intestinele sunt retrase ușor cu ajutorul unui forceps.



▼M7

Figura 6

Ambele capetele ale intestinelor și toate elementele mezenterice atașate sunt secționate cu ajutorul unei foarfeci.

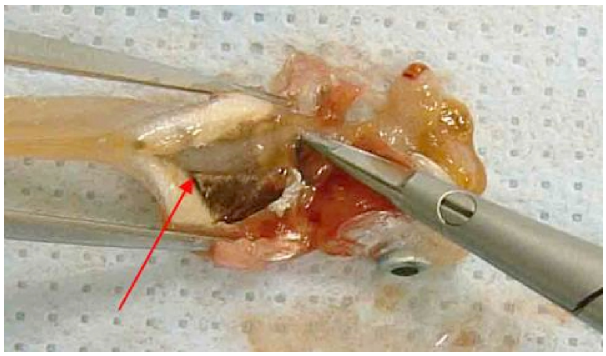


Figura 7 (femelă)

Procedura este identică în cazul femelei.

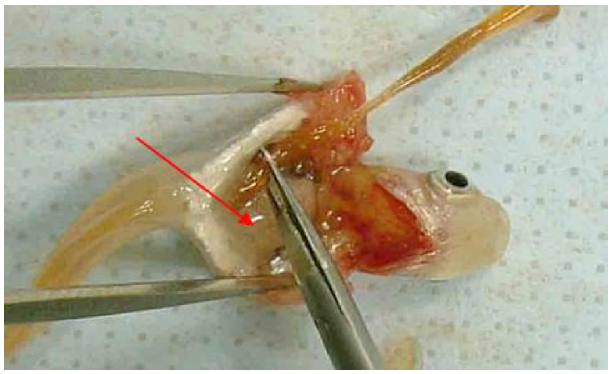
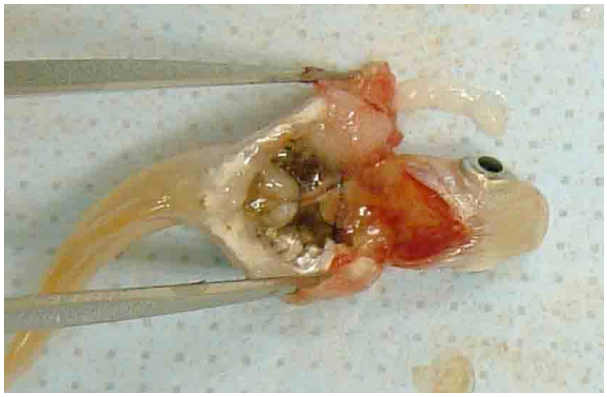


Figura 8

Procedură încheiată.



▼M7

Procedura 2 B: *Oryzias latipes*, pretratament al ficatului pentru analiza vitelogeninei

Se ia flaconul cu tamponul de omogenat din trusa ELISA și se răcește în bucăți cu gheață (temperatura soluției: ≤ 4 °C). În cazul în care se utilizează un tampon de omogenat din sistemul EnBio ELISA, se decongelează soluția până ajunge la temperatura camerei și apoi se răcește flaconul în bucăți de gheață.

Se calculează volumul tamponului de omogenat pentru ficat pe baza greutății sale (se adaugă 50 µl de tampon de omogenat per mg de ficat). De exemplu, în cazul în care greutatea ficatului este de 4,5 mg, volumul tamponului de omogenat pentru ficat este de 225 µl. Se întocmește o listă a volumelor de tampon de omogenat pentru toți ficații.

Se pregătește ficatul pentru pretratament.

(1) Se scoate de la congelator microtubul de 1,5 ml care conține ficatul chiar înainte de pretratament.

(2) Pretratamentul ficatului de la masculi trebuie realizat înaintea celui al femelelor pentru a evita contaminarea cu vitelogenină. În plus, pretratamentul pentru grupele de testare trebuie realizat în următoarea ordine: control, control cu solvent (dacă este cazul), cea mai mică concentrație, concentrație medie, cea mai mare concentrație și control pozitiv.

(3) Numărul microtuburilor de 1,5 ml care conțin probe de ficat scoase din congelator la un moment dat nu trebuie să depășească numărul care poate fi centrifugat în acel moment.

(4) Se aranjează microtuburile de 1,5 ml care conțin probe de ficat pe stativul cu gheață în ordinea numerotării eșantioanelor (nu este necesară decongelarea ficatului).

Efectuarea pretratamentului

1) Adăugarea tamponului de omogenat

Se verifică lista pentru a se identifica volumul de tampon de omogenat care trebuie utilizat pentru o anumită probă de ficat și se ajustează micropipeta (intervalul de volume: 100-1 000 µl) până la volumul adecvat. Se montează un vârf curat la micropipetă.

Se extrage tamponul de omogenat din flaconul cu reactiv și se adaugă tamponul în microtubul de 1,5 ml care conține ficatul.

Se adaugă tamponul de omogenat în toate microtuburile de 1,5 ml care conțin ficat conform procedurii descrise mai sus. Nu este necesară schimbarea vârfului micropipetei cu unul nou. Cu toate acestea, în cazul în care vârful este contaminat sau este suspectat a fi contaminat, acesta trebuie schimbat.

2) Omogenizarea ficatului

— Se atașează un nou pistil pentru omogenizare la omogenizatorul microtubului.

— Se introduce pistilul în microtubul de 1,5 ml. Se utilizează omogenizatorul microtubului pentru a presa ficatul între suprafața pistilului și peretele intern al microtubului de 1,5 ml.

— Se lasă omogenizatorul microtubului să funcționeze 10-20 de secunde. Se răcește microtubul de 1,5 ml cu ajutorul unor bucăți de gheață pe parcursul operațiunii.

▼M7

— Se scoate pistilul din microtubul de 1,5 ml și se lasă deoparte aproximativ 10 secunde. Se efectuează apoi un control vizual al stării suspensiei.

— Dacă bucățile de ficat sunt observate în suspensie, se repetă operațiunile (3) și (4) pentru a pregăti în mod satisfăcător omogenatul de ficat.

— Se răcește omogenatul de ficat în suspensie pe stativul cu gheață până în momentul centrifugării.

— Se schimbă pistilul cu unul nou pentru fiecare omogenat.

— Se omogenizează toți ficații cu tampon de omogenat conform procedurii descrise mai sus.

3) Centrifugarea omogenatului de ficat în suspensie

— Se fixează temperatura camerei frigorifice de centrifugare la ≤ 5 °C.

— Se introduc microtuburile de 1,5 ml care conțin omogenatul de ficat în suspensie în centrifuga frigorifică (se ajustează dacă este necesar).

— Se centrifughează omogenatul de ficat în suspensie la 13 000 *g* timp de 10 min la ≤ 5 °C. Cu toate acestea, dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat, forța și timpul de centrifugare pot fi ajustate după necesități.

— După centrifugare, se verifică dacă supernatantele sunt separate în mod adecvat (suprafață: lipide, intermediar: supernatant, strat inferior: țesut hepatic). Dacă separarea nu este adecvată, se centrifughează suspensia din nou în aceleași condiții.

— Se elimină toate probele din centrifuga frigorifică și se aranjează în ordinea numerotării eșantioanelor pe stativul cu gheață. Se procedează cu atenție pentru a nu resuspenda fiecare strat separat după centrifugare.

4) Colectarea supernatantului

— Se așază patru microtuburi de 0,5 ml pentru depozitarea supernatantului în stativul pentru tuburi.

— Se colectează 30 µl din fiecare supernatant (separat ca strat intermediar) cu micropipeta și se introduce într-un microtub de 0,5 ml. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

— Se colectează supernatantul și se introduce în celelalte două microtuburi de 0,5 ml în același mod ca cel descris mai sus.

— Se colectează restul supernatantului cu micropipeta (dacă este fezabil: ≥ 100 µl). Se introduce apoi supernatantul în microtubul de 0,5 ml rămas. Se procedează cu atenție pentru a nu colecta lipide de pe suprafață sau țesutul hepatic din stratul inferior.

— Se închide dopul microtubului de 0,5 ml și se notează volumul supernatantului pe etichetă. Apoi se răcesc imediat microtuburile pe stativul cu gheață.

— Se schimbă vârful micropipetei cu unul nou pentru fiecare supernatant. În cazul în care o cantitate mare de lipide se lipește de vârf, se schimbă imediat cu unul nou pentru a evita contaminarea extractului de ficat cu grăsime.

▼M7

— Se repartizează întregul supernatant centrifugat în patru microtuburi de 0,5 ml în conformitate cu procedura descrisă mai sus.

— După distribuirea supernatantului în microtuburile de 0,5 ml, se pun pe stativul pentru tuburi cu eticheta de identificare și apoi se introduc imediat în congelator. În cazul în care concentrațiile de VTG sunt măsurate imediat după pre-tratament, un microtub de 0,5 ml (conținând 30 µl de supernatant) se păstrează la rece în stativul pentru tuburi și se transferă în stația de lucru unde se realizează testul ELISA. În acest caz, se așază microtuburile rămase în stativele pentru tuburi și se introduc în congelator.

— După colectarea supernatantului, se elimină reziduurile în mod corespunzător.

Depozitarea eșantioanelor

Microtuburile de 0,5 ml conținând supernatantul omogenatului de ficat se depozitează la temperatura ≤ – 70 °C până în momentul utilizării acestora în cadrul testului ELISA.

Procedura 3A: Peștele-zebră, prelevare de sânge din vena/artera caudală

Imediat după anestezie, se secționează transversal pedunculul caudal și se prelevează probe de sânge din artera/vena caudală cu ajutorul unui tub capilar microhematocrit heparinizat. Volumele de sânge variază de la 5 la 15 µl în funcție de dimensiunile peștilor. Un volum egal de tampon de aprotinină (6 µg/ml în PBS) se adaugă în tubul microcapilar, iar plasma este separată de sânge prin centrifugare (5 minute la 600 *g*). Plasma este colectată în tuburi de testare și depozitată la o temperatură de –20 °C până în momentul analizei vitelogeninei sau a altor proteine care prezintă interes.

Procedura 3B: Peștele-zebră, prelevare de sânge prin puncție cardiacă

Pentru a evita coagularea sângelui și degradarea proteinelor, probele sunt colectate într-o soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) conținând heparină (1 000 unități/ml) și aprotinină — inhibitoare de protează (2 TIU/ml). Ca ingrediente pentru tampon, se recomandă heparină, sare de amoniu și aprotinină liofilizată. Pentru prelevarea de probe de sânge se recomandă utilizarea unei seringi (1ml) cu un ac subțire fix (de exemplu, Braun Omnikan-F). Seringa trebuie umplută în prealabil cu tampon (aproximativ 100 de microlitri) pentru a realiza o evaluare completă a volumelor sanguine mici de la fiecare pește. Probele de sânge sunt prelevate prin puncție cardiacă. Peștele trebuie anesteziat în prealabil cu MS-222 (100 mg/l). Un plan de anestezie corespunzător este cel care permite utilizatorului să distingă bătăile inimii peștelui-zebră. În timpul efectuării puncției cardiace, aplicați o tensiune ușoară pe pistonul seringii. Volumul de sânge prelevat se încadrează variază între 20-40 microlitri. După efectuarea puncției cardiace, amestecul de sânge și soluție tamponată trebuie introdus într-un tub de testare. Plasma este separată de sânge prin centrifugare (20 de minute; 5 000 *g*) și trebuie depozitată la o temperatură de – 80 °C până în momentul efectuării analizei.

Procedura 3C: POS: Peștele-zebră, omogenizarea capului și a cozii

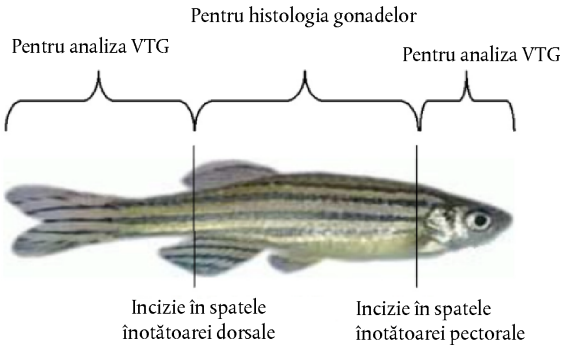
1. Peștii sunt anesteziați și eutanasiați conform descrierii testului.

2. Capul și coada peștelui sunt tăiate conform figurii 1.

Important: *Toate instrumentele de disecție, precum și planșa pentru efectuarea inciziilor trebuie clătite și curățate în mod corespunzător (de exemplu, cu etanol 96 %) între fiecare operațiune de manipulare a peștilor pentru a preveni „poluarea cu vitelogenină" de la femele sau de la masculii induși la masculii neinduși.*

▼M7

Figura 1



3. Greutatea materialului conținând cap și coadă de la fiecare pește este măsurată, rotunjindu-se greutatea la cea mai apropiată cifră întreagă în mg.

4. După cântărire, părțile sunt introduse în tuburi corespunzătoare (de exemplu, 1,5 ml Eppendorf) și congelate la o temperatură de – 80 °C până la omogenizare sau sunt direct omogenizate pe gheață cu ajutorul a două pistiluri din plastic. (Pot fi utilizate alte metode dacă sunt realizate pe gheață, iar rezultatul este o masă omogenă). Important: *Tuburile trebuie numerotate în mod corect astfel încât capul și coada peștelui să poată fi corelate cu secțiunea de corp corespunzătoare utilizată pentru histologia gonadelor.*

5. Atunci când se obține o masă omogenă, se adaugă un **tampon de omogenizare** ([1]) înghețat în greutate 4 x greutatea țesutului. Se continuă operațiunea cu ajutorul pistilurilor până ce amestecul devine omogen. Notă importantă: *Se utilizează pistiluri noi pentru fiecare pește.*

6. Probele se plasează pe gheață până la momentul centrifugării la 4 °C la 50 000 *g* timp de 30 min.

7. Se utilizează o pipetă pentru a repartiza câte 20 µl de supernatant în **cel puțin două** tuburi introducând vârful pipetei sub stratul de grăsime de la suprafață și aspirând cu grijă supernatantul fără nicio fracțiune de grăsime sau de granule.

8. Tuburile sunt depozitate la – 80 °C până în momentul utilizării.

([1]) Tamponul de omogenizare:
— [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % amestec de inhibitori de protează (Sigma)]: 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl amestec de inhibitori de protează.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), de exemplu de la BIE & Berntsen, Danemarca.
— Amestec de inhibitori de protează: De la Sigma (pentru țesut de mamifer) Numărul produsului P 8340.
NOTĂ: Tamponul de omogenizare trebuie utilizat în ziua fabricării sale. Se așează pe gheață în timpul utilizării.

▼M7

Apedicele 7

PROBE FORTIFICATE DE VITELOGENINĂ ȘI STANDARDUL DE REFERINȚĂ INTERTEST

De fiecare dată când sunt efectuate teste de măsurare a vitelogeninei, va fi analizată o probă fortificată obținută cu ajutorul unui standard de referință interteste Vitelogenina utilizată pentru prepararea standardului de referință interteste va proveni de la un lot diferit de cel utilizat pentru prepararea standardelor de calibrare pentru testul care urmează să fie realizat.

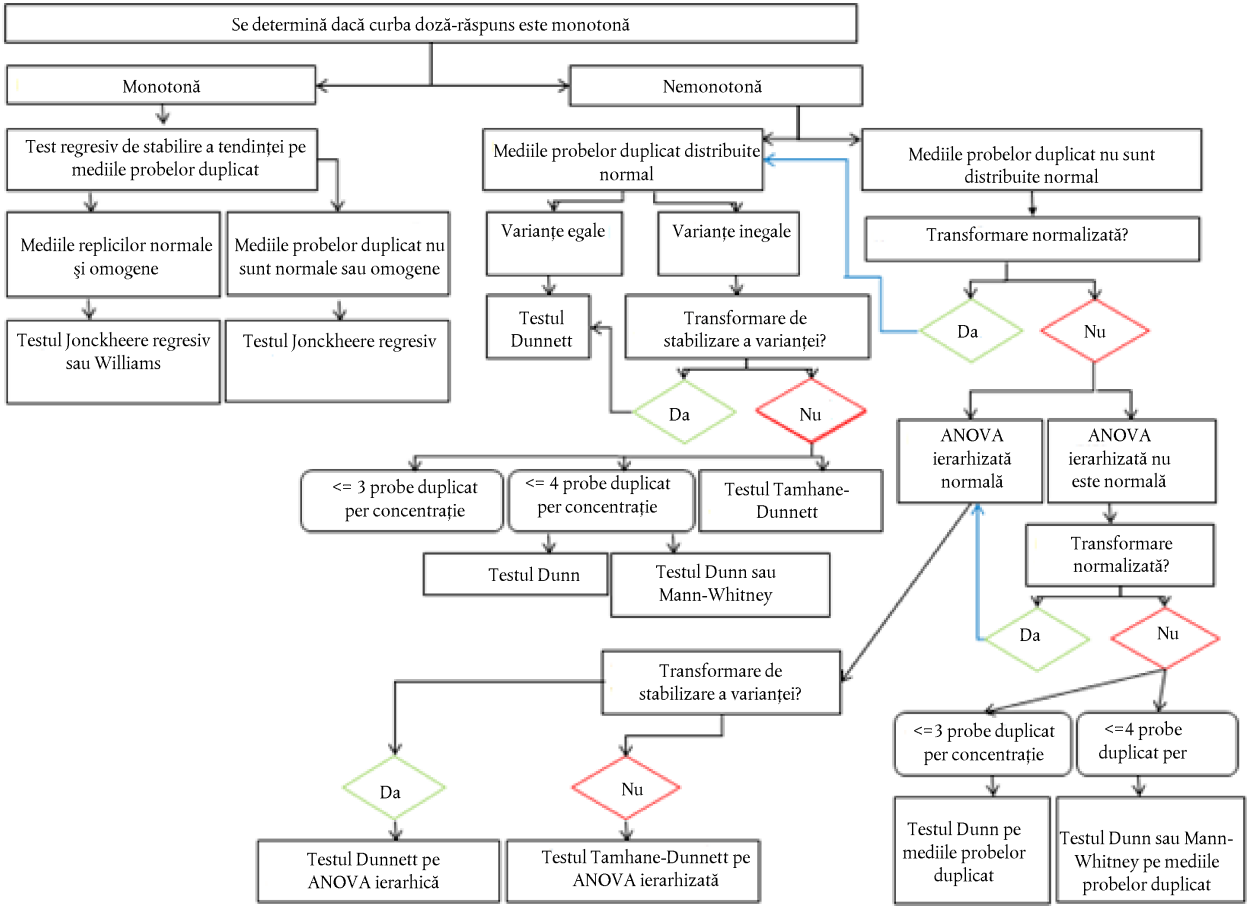
Proba fortificată va fi preparată prin adăugarea unei cantități cunoscute de standard interteste la o probă de plasmă de mascul de control Proba va fi fortificată pentru a obține o concentrație de vitelogenină între de 10 și de 100 de ori mai mare față de concentrația de vitelogenină preconizată pentru peștii masculi de control. Proba de plasmă de masculi de control care este fortificată poate proveni de la un singur pește sau poate fi un amestec de la mai mulți pești.

Un subeșantion de plasmă nefortificată de mascul de control va fi analizat în cel puțin două godeuri duplicat. Proba fortificată va fi analizată, de asemenea, în cel puțin două godeuri duplicat. Cantitatea medie de vitelogenină din cele două probe de plasmă nefortificate de mascul de control va fi adăugată la cantitatea calculată de vitelogenină adăugată la probele fortificate în vederea determinării concentrației preconizate. Raportul dintre respectiva concentrație preconizată și concentrația măsurată va fi raportat împreună cu rezultatele fiecărui set de teste efectuate în ziua respectivă.

▼M7

Apendicele 8

DIAGRAMĂ DECIZIONALĂ PENTRU ANALIZA STATISTICĂ



▼M7

C.49. TEST DE TOXICITATE ACUTĂ PE EMBRIONI DE PEȘTE (*FISH EMBRYO ACUTE TOXICITY* – FET)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare (MT) este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 236 (2013). Aceasta descrie un test de toxicitate acută pe embrioni de peștezebră (*Dario renio*). Acest test este conceput pentru determinarea toxicității acute a substanțelor chimice asupra stadiilor embrionare ale peștilor. Testul FET se bazează pe studii și activități de validare efectuate asupra peștelui-zebră (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Testul FET a fost aplicat cu succes unei game largi de substanțe chimice care prezintă diferite moduri de acțiune și grade de volatilitate, solubilitate și hidrofobicitate (trecute în revistă în notele 15 și 16).

2. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Ouăle de pește-zebră nou fertilizate sunt expuse unei substanțe chimice pentru o perioadă de 96 de ore. La fiecare 24 de ore, se înregistrează până la patru observații apicale drept indicatori de letalitate (6): (i) coagularea ouălor fertilizate, (ii) lipsa formării de somite, (iii) lipsa desprinderii mugurelui caudal de sacul vitelin și (iv) lipsa bătăilor inimii. La finalul perioadei de expunere, toxicitatea acută se determină pe baza unui rezultat pozitiv în oricare dintre cele patru observații apicale înregistrate și se calculează LC_{50}.

CONSIDERAȚII INIȚIALE

4. Informațiile utile privind proprietățile specifice substanței includ formula structurală, greutatea moleculară, puritatea, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a și K_{ow}, solubilitatea în apă și presiunea vaporilor, precum și rezultatele unui test de biodegradabilitate rapidă [MT C.4 (17) sau MT C.29 (18)]. Solubilitatea și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă se pot înregistra pierderi datorate evaporării substanței chimice de testare. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței în soluțiile de testare, a cărei precizie și ale cărei limite de detecție să fie cunoscute și raportate.

5. În cazul în care metoda de testare este utilizată pentru testarea unui amestec, compoziția acestuia trebuie să fie caracterizată, pe cât posibil, de exemplu prin identitatea chimică a constituenților săi, prezența lor cantitativă și proprietățile specifice substanței (a se vedea punctul 4). Înainte de utilizarea acestei metode de testare pentru testarea unui amestec în scopul reglementării, trebuie luat în considerare dacă aceasta va oferi rezultate acceptabile pentru procesul de reglementare.

6. În ceea ce privește substanțele care pot fi activate prin intermediul metabolismului, există dovezi conform cărora peștii-zebră au într-adevăr capacități de biotransformare (19)(20)(21)(22). Cu toate acestea, capacitatea metabolică a peștilor în stadiu embrionar nu este întotdeauna similară cu cea a peștilor alevini sau adulți. De exemplu, alcoolul alilic cu efect toxic (9) nu a fost inclus în testul FET. Prin urmare, în cazul în care există indicii că metaboliții sau alți produși de transformare relevanți pot fi mai toxici decât compusul părinte, se recomandă, de asemenea, efectuarea testului cu acești metaboliți/produși de transformare, precum și utilizarea rezultatelor la elaborarea concluziilor despre toxicitatea substanței chimice de testare sau, alternativ, se efectuează un alt test care ia în considerare, de asemenea, metabolismul.

7. În cazul substanțelor cu o greutate moleculară ≥ 3kDa, cu o structură moleculară foarte voluminoasă și în cazul substanțelor care provoacă o eclozare întârziată care ar putea împiedica sau reduce expunerea după eclozare, nu se așteaptă ca embrionii să fie sensibili din cauza biodisponibilității limitate a substanței și se recomandă alte teste de toxicitate mai adecvate.

▼M7

VALIDITATEA TESTULUI

8. Pentru ca rezultatele testului să fie valide, se aplică următoarele criterii:

a) Rata generală de fertilizare a ouălor colectate trebuie să fie ≥ 70 % în lotul testat.

b) Temperatura apei trebuie să fie menținută la 26 ± 1 °C în camerele de testare în orice moment al testului.

c) Supraviețuirea generală a embrionilor din controlul negativ (apă de diluție) și, după caz, din controlul solvent trebuie să fie ≥ 90 % până la sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore.

d) Expunerea la controlul pozitiv (de exemplu, 4,0 mg/l 3,4 dichloroanilină pentru peștele-zebră) trebuie să aibă ca rezultat o mortalitate de cel puțin 30 % la sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore.

e) Rata de eclozare în controlul negativ (și controlul cu solvent, dacă este cazul) trebuie să fie ≥ 80 % la sfârșitul expunerii de 96 de ore.

f) La sfârșitul perioadei de expunere de 96 de ore, concentrația de oxigen dizolvat în controlul negativ și concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie ≥ 80 % din saturație.

DESCRIEREA METODEI

9. O prezentare generală a condițiilor de întreținere și de testare recomandate este disponibilă în apendicele 2.

Aparatură

10. Următoarele echipamente sunt necesare:

a) Bazine din material chimic inert (de exemplu sticlă) și cu o capacitate adecvată în raport cu încărcarea recomandată (a se vedea „Menținerea peștilor reproducători”, punctul 14).

b) Microscop inversat și/sau binocular cu o capacitate de mărire de cel puțin 80 de ori. În cazul în care temperatura din încăperea utilizată pentru înregistrarea de observații nu poate fi ajustată la 26 ± 1 °C, este necesar un stadiu de mișcare încrucișată cu temperatură controlată sau utilizarea altor metode de menținere a temperaturii;

c) Camere de testare; de exemplu, plăci standard cu 24 de godeuri cu o adâncime de aproximativ 20 mm. (a se vedea „Camere de testare”, punctul 11);

d) de exemplu, folie autoadezivă pentru a acoperi plăcile cu 24 de godeuri;

e) Incubator sau cameră climatizată cu temperatură controlată, care să permită menținerea unei temperaturi de 26 ± 1 °C în godeuri (sau în camerele de testare);

f) pH-metru;

g) Aparat pentru măsurarea oxigenului;

h) Echipament pentru determinarea durității și conductivității apei;

i) Captor de gameți: tăvi instrumentare din sticlă, oțel inoxidabil sau alte materiale inerte; plasă metalică (mărimea grilajului 2 ± 0,5 mm) din oțel inoxidabil sau alt material inert care să protejeze ouăle după ce sunt depuse; substrat de reproducere (de exemplu, imitații de plante din material inert) [MT C.48, apendicele 4a (23)];

j) Pipete cu deschideri lărgite pentru a colecta ouă;

▼M7

k) Vase din sticlă pentru a pregăti diferite concentrații de testare și apa de diluție (pahare de laborator, flacoane gradate, cilindri gradați și pipete gradate) sau pentru a colecta ouă de la peștele-zebră (de exemplu, pahare de laborator, vase de cristalizare);

l) În cazul în care pentru efectuarea testului sunt utilizate sisteme alternative de expunere, cum ar fi dozarea dinamică (24) sau pasivă (25), sunt necesare facilități și echipamente adecvate.

Camere de testare

11. Se utilizează camere de testare din sticlă sau polistiren (de exemplu, plăci cu 24 de godeuri, cu o capacitate de umplere de 2,5-5 µl per godeu). În cazul în care se suspectează adsorbția la polistiren (de exemplu, pentru substanțe plane, nepolare cu K_{OW} ridicat), se vor folosi materiale inerte (sticlă) pentru a reduce pierderile datorate adsorbției (26). Camerele de testare trebuie să fie poziționate aleatoriu în incubator.

Apa și condițiile de testare

12. Diluarea apei de întreținere se recomandă în vederea obținerii unor niveluri de duritate tipice pentru mai multe tipuri de apă de suprafață. Apa de diluție trebuie să fie preparată din apă reconstituită (27). Gradul de duritate rezultat trebuie să fie echivalent cu 100-300 mg/l $CaCO_3$ pentru a preveni precipitarea excesivă a carbonatului de calciu. Poate fi utilizată, de asemenea, apă de fântână sau un alt tip de apă cu caracteristici similare. Apa reconstituită poate fi adaptată în apă de întreținere cu duritate scăzută prin diluarea cu apă deionizată până la un raport de 1:5 până la o duritate minimă de 30-35 mg/l $CaCO_3$. Apa se aerează la saturația oxigenului înaintea adăugării substanței chimice de testare. Temperatura trebuie menținută la 26 ± 1 °C, în toate godeurile, pe întreaga durată a testului. Valoarea pH-ului trebuie să se situeze între 6,5 și 8,5 și să nu varieze cu mai mult de 1,5 unități pe parcursul testului. Dacă nu se estimează că pH-ul va rămâne în acest interval, ajustarea pH-ului trebuie realizată înainte de începutul testului. Se recomandă ca reglarea pH-ului să se efectueze astfel încât concentrația soluției stoc să nu fie schimbată semnificativ și să nu apară nicio reacție chimică sau precipitare a substanței chimice de testare. Se recomandă utilizarea de hidrogen clorurat (HCl) și hidroxid de sodiu (NaOH) pentru corectarea pH-ului în soluțiile care conțin substanța chimică de testare.

Soluții de testare

13. Soluțiile de testare a concentrațiilor selectate pot fi preparate, de exemplu, prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc se prepară de preferință prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testare în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, agitare și/sau ultrasunete). În cazul în care substanța chimică de testare este greu de dizolvat în apă, se vor respecta procedurile descrise în Documentul de orientare al OCDE nr. 23 privind manipularea substanțelor și amestecurilor dificile (28). Utilizarea solvenților trebuie evitată, dar aceștia pot fi necesari în anumite situații pentru a produce o soluție stoc cu o concentrație corespunzătoare. În cazul în care se utilizează un solvent pentru a contribui la prepararea soluției stoc, concentrația sa finală nu trebuie să depășească 100 µl/l și trebuie să fie aceeași în toate vasele de testare. Dacă se utilizează un solvent, este necesar un grup de control suplimentar cu solvent.

Întreținerea peștilor reproducători

14. Pentru producția de ouă, se folosește un efectiv de reproducere de pești-zebră neexpuși de tip sălbatic, cu o rată de fertilizare a ouălor bine documentată. Peștii nu trebuie să prezinte simptome de infecție și de maladie sesizabile din punct de vedere macroscopic și nu trebuie să fi fost supuși unui tratament medicamentos (pentru afecțiuni acute sau profilactic) timp de 2 luni înainte de eliberarea gameților. Peștii reproducători sunt ținuți în acvarii cu o capacitate de încărcare recomandată de 1 l de apă per pește și o perioadă fixă de

▼M7

expunere la lumină de 12-16 ore (29)(30)(31)(32)(33). Ratele optime de filtrare trebuie ajustate; se vor evita ratele de filtrare excesive care determină perturbarea masivă a apei. Pentru condițiile de hrănire, a se vedea apendicele 2. Surplusul de hrană trebui evitat, iar calitatea apei și curățenia acvariilor trebui monitorizate regulat și readuse la starea inițială, dacă este necesar.

Testarea competenței

15. Ca substanță de referință, 3,4-dicloranilina [utilizată în studiile de validare (1)(2)] trebuie testată într-un interval complet concentrație-răspuns pentru a verifica sensibilitatea susei de pește utilizată, de preferință de două ori pe an. Pentru orice laborator care stabilește inițial această determinare, se va folosi substanța chimică de referință. Un laborator poate utiliza această substanță chimică pentru a-și demonstra competența tehnică în ceea ce privește efectuarea determinării înainte de transmiterea datelor în scopuri de reglementare.

Producția de ouă

16. Ouăle de pește-zebră pot fi produse prin grupurile de eliberare a gameților (în acvarii individuale de eliberare a gameților) sau prin eliberarea de gameți în masă (în bazine de întreținere). În cazul grupurilor de eliberare a gameților, masculii și femelele (de exemplu, într-un raport de 2:1) dintr-un grup de reproducere sunt plasați în bazine de eliberare a gameților cu câteva ore înainte de apusul soarelui, în ziua anterioară testului. Întrucât grupurile de pești-zebră de eliberare a gameților ar putea ocazional să nu poată elibera gameți, este recomandată utilizarea în paralel a cel puțin trei acvarii de eliberare a gameților. Pentru a evita influențele genetice, ouăle sunt colectate de la cel puțin trei grupuri de reproducere, amestecate și selectate în mod aleatoriu.

17. Pentru colectarea ouălor, se plasează captoare de gameți în bazinele de eliberare a gameților sau în bazinele de întreținere înainte de apusul soarelui în ziua anterioară testului sau înainte de răsăritul soarelui în ziua testului. Pentru a preveni prădarea ouălor de către peștii-zebră adulți, captoarele de gameți sunt acoperite cu plasă metalică inertă cu o dimensiune adecvată a ochiurilor (aproximativ 2 ± 0,5 mm). Dacă se consideră că este necesar, de plasa metalică se fixează plante artificiale din materiale inerte (de exemplu, plastic sau sticlă) ca stimuli pentru eliberarea de gameți (3)(4)(5)(23)(35). Trebuie folosite materiale din plastic alterat care nu dezalcalinizează (de exemplu, ftalați). Împerecherea, eliberarea de gameți și fertilizarea au loc în primele 30 de minute după răsăritul soarelui, iar captoarele de gameți cu ouăle colectate pot fi îndepărtate cu grijă. Se recomandă clătirea ouălor cu apă reconstituită după colectarea acestora din captoare.

Diferențierea ouălor

18. La 26 °C, ouăle fertilizate sunt supuse primei divizări după aproximativ 15 minute, iar divizările consecutive sincrone formează 4, 8, 16 și 32 de blastomere (a se vedea apendicele 3) (35). În aceste etape, ouăle fertilizate pot fi identificate în mod clar prin dezvoltarea unei blastule.

PROCEDURA

Condiții de expunere

19. Douăzeci de embrioni per concentrație (un embrion per godeu) sunt expuși substanței chimice de testare. Expunerea trebuie să fie de așa natură încât ± 20 % din concentrația chimică nominală să se mențină pe toată durata testului. Dacă acest lucru nu este posibil într-un sistem static, se va aplica un interval de reînnoire semistatic flexibil (de exemplu, reînnoire la fiecare 24 de ore). În aceste cazuri, concentrațiile de expunere trebuie să fie verificate ca un minim în concentrația cea mai mare și cea mai scăzută la începutul și la sfârșitul fiecărui interval de expunere (a se vedea punctul 36). Dacă nu se poate menține o concentrație de expunere de ± 20 % din concentrațiile nominale, toate concentrațiile trebuie măsurate la începutul și la sfârșitul fiecărui interval de expunere (a se vedea punctul 36). În momentul reînnoirii, trebuie avut grijă ca embrionii să rămână acoperiți de o cantitate mică din vechile soluții de testare pentru a preveni uscarea lor. Conceptul de testare

▼M7

poate fi adaptat astfel încât să îndeplinească cerințele de testare ale substanțelor respective (de exemplu, sisteme de dozare în regim dinamic (24) sau pasive (25) pentru substanțe ușor degradabile sau cu o capacitate mare de adsorbție (29), sau altele pentru substanțe volatile (36)(37)). În orice caz, trebuie luate măsuri pentru a reduce la minimum orice tip de stres asupra embrionilor. Camerele de testare trebuie să fie condiționate timp de cel puțin 24 de ore cu soluțiile de testare înainte de începerea testului. Condițiile de testare sunt prezentate pe scurt în apendicele 2.

Concentrațiile de testare

20. În mod normal, sunt necesare cinci concentrații ale substanței chimice de testare, spațiate de un factor constant care nu depășește 2,2 pentru a îndeplini cerințele statistice. În cazul în care se utilizează mai puțin de cinci concentrații, se va prezenta justificarea alegerii. Cele mai mari concentrații de testare trebuie să aibă, de preferință, drept rezultat o letalitate de 100 %, iar cea mai scăzută concentrație de testare trebuie de preferință să nu producă niciun efect observabil, astfel cum este definit la punctul 28. Un test de stabilire a intervalului înainte de testul definitiv permite selectarea unui interval adecvat de concentrații. Stabilirea intervalului se efectuează în mod obișnuit folosind zece embrioni per concentrație. Următoarele instrucțiuni se referă la efectuarea testului pe plăci cu 24 de godeuri. În cazul în care se folosesc camere de testare diverse (de exemplu, vase mici Petri) sau se testează mai multe concentrații, instrucțiunile trebuie ajustate corespunzător.

21. Detalii și instrucțiuni vizuale pentru alocarea concentrațiilor pe plăcile cu 24 de godeuri sunt disponibile la punctul 27 și în apendicele 4 figura 1.

Controale

22. Sunt necesare controale cu apă de diluție în calitate de control negativ și plăci de control intern. Dacă se observă mai mult de 1 embrion mort în placa de control intern, placa este respinsă, reducând astfel numărul de concentrații utilizate pentru a deriva LC_{50}. În cazul în care se respinge o placă întreagă, capacitatea de a evalua și de a distinge efectele observate ar putea să fie îngreunată, în special în cazul în care placa respinsă este cea de control cu solvent sau o placă în care embrionii tratați sunt de asemenea afectați. În primul caz, testul trebuie repetat. În cel de al doilea caz, pierderea unui grup/mai multor grupuri supus(e) tratamentului datorită mortalității controlului intern poate să limiteze abilitatea de a evalua efectele și de a determina valorile LC_{50}.

23. Un control pozitiv la o concentrație fixă de 4 mg/l 3,4-dicloranilină se efectuează pentru fiecare lot de ouă utilizate pentru testare.

24. În cazul în care se utilizează un solvent, un grup suplimentar de 20 de embrioni este expus solventului pe o placă separată cu 24 de godeuri, servind astfel drept probă de control cu solvent. Pentru ca testul să fie considerat acceptabil, trebuie să se demonstreze că solventul nu are efecte semnificative asupra momentului de eclozare, asupra supraviețuirii și că nu produce alte efecte adverse asupra embrionilor (a se vedea punctul 8c).

Începerea expunerii și durata testului

25. Testul începe cât mai curând posibil după fertilizarea ouălor și se încheie după 96 de ore de expunere. Embrionii trebuie să fie imersați în soluțiile de testare înainte de diviziunea blastodiscului sau cel târziu până în stadiul diviziunii în 16 celule. Pentru a începe expunerea cu o întârziere minimă, cel puțin de două ori mai multe ouă necesare pentru fiecare grup supus tratamentului sunt alese aleatoriu și transferate în concentrațiile și controalele respective (de exemplu, în 100 ml de vase de cristalizare; ouăle trebuie să fie complet acoperite) nu mai târziu de 90 de minute după fertilizare.

26. Ouăle fecundate viabile trebuie separate de ouăle nefertilizate și transferate în plăci cu 24 de godeuri condiționate în prealabil timp de 24 de ore și

▼M7

reumplute cu 2 ml/godeu de soluții de testare proaspăt pregătire în cel mult 180 de minute după fertilizare. Cu ajutorul stereomicroscopiei (de preferință cu o capacitate de mărire de ≥30), se vor selecta ouăle fertilizate supuse divizării și care nu prezintă iregularități evidente în timpul divizării (de exemplu, asimetrie, formare de vezicule) sau leziuni ale corionului. Pentru colectarea de ouă și separare, a se vedea apendicele 3 figurile 1 și 3, precum și apendicele 4 figura 2.

Distribuția de ouă pe plăcile cu 24 de godeuri

27. Ouăle se distribuie în plăci cu godeuri în următoarele numere (a se vedea, de asemenea, apendicele 4 figura 1)

— 20 de ouă pe o placă pentru fiecare concentrație de testare;

— 20 de ouă ca și control solvent pe o placă (dacă este necesar);

— 20 de ouă ca și control pozitiv pe o placă;

— 4 ouă în apă de diluție în calitate de control intern pe fiecare dintre plăcile de mai sus;

— 24 de ouă în apă de diluție în calitate de control negativ pe o placă.

Observații

28. Observațiile apicale efectuate pe fiecare embrion testat includ: coagularea embrionilor, lipsa formării de somite, lipsa desprinderii cozii și lipsa bătăilor inimii (tabelul 1). Aceste observații sunt utilizate pentru a determina letalitatea: Orice rezultat pozitiv pentru oricare dintre aceste observații indică faptul că embrionul de pește-zebră este mort. Suplimentar, se înregistrează eclozarea în grupurile supuse tratamentului și în grupurile de control în fiecare zi începând după 48 de ore. Observațiile sunt înregistrate odată la 24 de ore, până la finalul testului.

Tabelul 1

Observațiile apicale de toxicitate acută la embrionii de pește-zebră la 24-96 de ore după fertilizare

	Timpi de expunere			
	24 de ore	48 de ore	72 de ore	96 de ore
Embrioni coagulați	+	+	+	+
Lipsa formării de somite	+	+	+	+
Nedesprinderea cozii	+	+	+	+
Absența bătăilor inimii		+	+	+

29. *Coagularea embrionului:* Embrionii coagulați au o culoare alb-lăptos și par întunecați la microscop (a se vedea apendicele 5 figura 1). Numărul de embrioni coagulați se determină după 24, 48, 72 și 96 de ore.

30. *Lipsa formării de somite:* La o temperatură de 26 ± 1 °C, aproximativ 20 de somite sau format după 24 de ore (a se vedea apendicele 5 figura 2) într-un embrion de pește-zebră cu dezvoltare normală. Un embrion normal dezvoltat prezintă mișcări spontane (contractări orizontale). Mișcările spontane indică formarea de somite. Absența somitelor se înregistrează după 24, 48, 72 și 96 de ore. Lipsa formării de somite după 24 de ore ar putea fi datorată unei întârzieri generale de dezvoltare. Cel târziu după 48 de ore, formarea de somite ar trebui să fie dezvoltată. Dacă nu, embrionii sunt considerați morți.

31. *Lipsa desprinderii cozii:* La un embrion de pește-zebră dezvoltat normal, desprinderea cozii (a se vedea apendicele 5 figura 3) de sac se observă

▼M7

în urma elongării posterioare a corpului embrionic. Absența desprinderii cozii este înregistrată după 24, 48, 72 și 96 de ore.

32. *Absența bătăilor inimii:* La un embrion de pește-zebră dezvoltat normal la o temperatură de 26 ± 1 °C, pulsul este vizibil după 48 de ore (a se vedea apendicele 5 figura 4). Se va acorda o atenție deosebită atunci când se înregistrează acest punct final, având în vedere că bătăile neregulate *nu* trebuie să fie considerate letale. În plus, bătăile inimii care sunt vizibile fără circulație în aorta abdominală nu sunt considerate letale. Pentru a înregistra acest punct final, embrionii care nu prezintă nicio bătaie a inimii trebuie observați sub o mărire de 80 de ori timp de cel puțin un minut. Absența bătăilor inimii este înregistrată după 48, 72 și 96 de ore.

33. Ratele de eclozare ale tuturor grupurilor supuse tratamentului și ale celor de control trebuie înregistrate și raportate începând după 48 de ore. Deși eclozarea nu constituie un punct final folosit pentru calcularea LC_{50}, aceasta asigură expunerea embrionului fără o potențială funcție de blocare a corionului, ceea ce ar putea contribui la interpretarea datelor.

34. Descrieri detaliate ale dezvoltării normale (35), precum și exemple de dezvoltare anormală la embrionii de pește-zebră sunt ilustrate în apendicele 3 și 5.

Măsurători analitice

35. La începutul și la sfârșitul testului, se vor măsura pH-ul, duritatea totală și conductivitatea în proba (probele) de control și în cea mai mare concentrație a substanței chimice de testare. În sistemele de reînnoire în regim semistatic, pH-ul trebuie măsurat înainte și după reînnoirea apei. Se măsoară concentrația de oxigen dizolvat la sfârșitul testului în probele de control negativ și concentrația cea mai mare de testare cu embrioni viabili, unde trebuie să fie în conformitate cu criteriile de validitate a testului (a se vedea punctul 8f). În cazul în care există preocupări că temperatura variază în rândul plăcilor cu 24 de godeuri, temperatura este măsurată în trei vase selectate în mod aleatoriu. Temperatura ambientală trebuie să fie înregistrată, de preferință, în mod continuu pe perioada testului sau cel puțin zilnic.

36. Într-un sistem static, concentrația substanței chimice de testare trebuie să fie măsurată cel puțin în cea mai scăzută și cea mai mare concentrație de testare, dar de preferință în toate tratamentele, la începutul și la sfârșitul testului. La testele (de reînnoire) în regim semistatic, în cazul în care concentrația substanței chimice de testare este preconizată să rămână în intervalul de ± 20 % din valorile nominale, se recomandă, cel puțin, ca cea mai mare și cea mai scăzută concentrație de testare să fie analizate atunci când sunt proaspăt pregătite și imediat înainte de reînnoire. La testele în care concentrația substanței testate nu se preconizează să rămână în intervalul de ± 20 % din valoarea nominală, toate concentrațiile de testare trebuie analizate atunci când sunt proaspăt preparate și imediat înainte de reînnoire. În cazul unui volum insuficient pentru analiză, se poate dovedi utilă fuzionarea soluțiilor de testare sau utilizarea unor camere surogat din același material și cu același raport volum/suprafață ca plăcile cu 24 de godeuri. Se recomandă ca rezultatele să fie fundamentate pe concentrații măsurate. Atunci când concentrațiile nu se încadrează în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală, concentrațiile de efect trebuie exprimate în legătură cu media geometrică a concentrațiilor măsurate; pentru detalii suplimentare a se vedea capitolul 5 din Documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (28).

TEST LA VALORI-LIMITĂ

37. Folosind procedurile descrise în această metodă de testare, un test la valori-limită poate fi efectuat la 100 mg/l din substanța chimică de testare sau la limita sa de solubilitate în mediul de testare (oricare este mai scăzută) pentru a demonstra că LC_{50} este mai mare decât această concentrație. Testul

▼M7

la
valori-limită trebuie să se efectueze folosind 20 de embrioni aflați sub tratament, controlul pozitiv și – dacă este necesar – în controlul solvent și 24 de embrioni în controlul negativ. În cazul în care procentul de letalitate la concentrația testată depășește mortalitatea în controlul negativ (sau controlul solvent) cu 10 %, se efectuează un studiu complet. Trebuie înregistrate toate efectele observate. În cazul în care mortalitatea depășește 10 % în controlul negativ (sau controlul solvent), testul devine nul și trebuie repetat.

DATE ȘI RAPORTARE

Interpretarea rezultatelor

38. În cadrul acestui test, godeurile individuale sunt considerate duplicate independente pentru analiza statistică. Procentele de embrioni pentru care cel puțin una dintre observațiile apicale este pozitivă în 48 și/sau 96 de ore sunt reprezentate față de concentrațiile de testare. Pentru a calcula pantele curbei, valorile LC_{50} și limitele de încredere (95 %), se vor aplica metode statistice adecvate (38) și se va consulta Documentul de orientare al OCDE privind abordările curente în analiza statistică a datelor de ecotoxicitate (39).

Raport de testare

39. Raportul de testare trebuie să conțină următoarele date:

Substanța chimică testată:

Substanță mono-constituent

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum numele IUPAC sau CAS, numărul CAS, codul SMILES sau InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților ca fiind adecvată și practic realizabilă etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanță multi-constituent, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale componentelor.

Organisme de testare:

— numele științific, sușa, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

— procedura de testare utilizată (de exemplu, reînnoire semistatică);

— perioada de expunere la lumină;

— conceptul de testare (de exemplu, numărul de camere de testare, tipurile de controale);

— caracteristicile de calitate a apei în menținerea peștilor (de exemplu, pH, duritate, temperatură, conductivitate, oxigen dizolvat);

— concentrația oxigenului dizolvat, pH, duritate totală, temperatura și conductivitatea soluțiilor de testare la început și după 96 de ore;

— metoda de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, precum și frecvența de reînnoire;

▼M7

— justificarea utilizării unui solvent și justificarea alegerii solventului, dacă este altul decât apa;

— concentrațiile de testare nominale și rezultatul tuturor analizelor pentru determinarea concentrației substanței de testare în vasele de testare; eficiența de recuperare a metodei și limita de cuantificare (LoQ) trebuie raportate, de asemenea;

— date care să demonstreze că s-au îndeplinit criteriile de validitate a ratei de supraviețuire globală în cazul probelor de control;

— rata de fertilizare a ouălor;

— rata de eclozare în grupul supus tratamentului și cel de control.

Rezultate:

— concentrația maximă care nu provoacă mortalitate pe durata testului;

— concentrația minimă care provoacă o mortalitate de 100 % pe durata testului;

— mortalitatea cumulată pentru fiecare concentrație la momentele de observare recomandate;

— valorile LC_{50} la 96 de ore (și opțional la 48 de ore) pentru mortalitate cu limite de încredere de 95 %, dacă este posibil;

— graficul curbei concentrație-mortalitate la sfârșitul testului;

— mortalitatea din cadrul probelor de control (controale negative, plăci de control intern, precum și control pozitiv și orice fel de control cu solvent utilizat);

— date privind rezultatul fiecăreia dintre cele patru observații apicale;

— incidența și descrierea anomaliilor morfologice și fiziologice, dacă este cazul (a se vedea exemplele din apendicele 5 figura 2);

— incidente care au survenit pe parcursul testului și care ar fi putut influența rezultatele;

— analiza statistică și interpretarea datelor (analiza probit, modelul de regresie logistică și media geometrică pentru LC_{50});

— panta și limitele de încredere ale regresiei curbei (transformate) concentrație-răspuns.

Orice abatere de la metoda de testare și explicațiile relevante.

Discutarea și interpretarea rezultatelor.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Capitolul C.4 din prezenta anexă: Biodegradabilitate rapidă.

(18) Capitolul C.29 din prezenta anexă: Biodegradabilitate rapidă, CO_2 în vase sigilate.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Capitolul C.48 din prezenta anexă: Test de reproducere cu durată scurtă la pești. A se vedea apendicele 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) European Commission (2007) Commission recommendation 2007/526/EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) European Union (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Capitolul C.2 din prezenta anexă: Daphnia sp., test de imobilizare acută.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Punct final apical: care provoacă efecte la nivel de populație.

Blastulă: o formațiune celulară în jurul polului animal care acoperă o anumită parte a sacului.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

Epibolie: o proliferare masivă a celulelor predominant epidermale în faza de gastrulație a embrionului și mișcarea acestora dinspre partea dorsală către cea ventrală, prin care straturile celulei entodermale sunt internalizate într-un proces asemănător invaginației, iar sacul este încorporat în embrion.

Test în regim dinamic: un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare pe parcursul perioadei de expunere.

Placă de control intern: controlul intern constând în 4 godeuri umplute cu apă de diluție per placa cu 24 de godeuri pentru a identifica o potențială contaminare a plăcilor de către producător sau de către cercetător pe durata procedurii, precum și orice efect de placă ce ar putea să influențeze rezultatul testului (de exemplu, gradient de temperatură).

IUPAC: Uniunea internațională de chimie pură și aplicată

Apa de întreținere: apa în care are loc creşterea peştelui adult.

Concentrația letală medie (LC_{50}): concentrația unui produs chimic de testare care este considerat letal pentru 50 % din organismele testate pe durata testului.

Test de reînnoire semistatic: un test cu reînnoirea periodică a soluțiilor de testare după perioade definite (de exemplu, la fiecare 24 de ore).

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Somite: în procesul de dezvoltare a embrionului vertebrat, somitele constituie mase de mezoderm distribuite lateral de tubul neural, care se vor transforma ulterior în dermă (dermatom), mușchi scheletic (miotom) și vertebre (sclerotom).

Test static: un test în care soluțiile de testare rămân neschimbate pe toată durata testului.

Substanța chimică de testare: orice substanță sau amestec testate cu ajutorul prezentei metode de testare.

UVCB: substanțele cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice

▼M7

Apendicele 2

ÎNTREȚINEREA, REPRODUCEREA ȘI CONDIȚIILE TIPICE PENTRU TESTELE DE TOXICITATE ACUTĂ PE EMBRIONII DE PEȘTE-ZEBRĂ

Peștele-zebră (*Danio rerio*)		
Originea speciei		India, Birmania, Malacca, Sumatra
Dimorfism sexual		Femele: abdomen proeminent când poartă ouă Masculi: mai subțiri, nuanță portocalie între dungile longitudinale albastre (în special evidentă la înotătoarea anală)
Regimul de hrănire		Hrană uscată sub formă de fulgi (maxim 3 % din greutatea peștelui zilnic) de 3-5 ori pe zi; *nauplius de Artemis* și/sau dafnii de mărime adecvată provenind din sursă necontaminată. Hrănirea cu hrană vie reprezintă o sursă de îmbogățire a mediului de viață, prin urmare, trebui să se ofere hrană vie ori de câte ori este posibil. Pentru a garanta o calitate optimă a apei, hrana în exces și materiile fecale trebuie îndepărtate la aproximativ o oră după hrănire.
Greutatea aproximativă a peștilor adulți		Femele: 0,65 ±0.13 g Masculi: 0,5 ±0,1 g
Întreținerea peștilor părinți	Iluminarea	Becuri fluorescente (spectru larg); 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1080 lucși sau 50-100 ft-c (niveluri ambientale de laborator); perioadă de expunere la lumină de 12-16 ore
	Temperatura apei	26 ±1 °C
	Calitatea apei	O_2 ≥80 % saturație, duritate: de exemplu ~30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48mg/l, NH_4^+ și NO_2^-: <0,001 mg/l, clor rezidual <10 µg/l, clor organic total <25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Alte criterii de calitate a apei	Particule în suspensie < 20 mg/l, carbon organic total < 2 mg/l, Total pesticide organofosforice totale < 50 ng/l, pesticide organoclorurate totale plus bifenili policlorurați < 50 ng/l
	Mărimea rezervorului de întreținere	De exemplu, 180 l, 1 pește/l
	Epurarea apei	Permanent (filtrare cu cărbune); alte posibilități includ combinații cu întreținere prin reînnoire semistatică sau în regim dinamic cu reînnoirea continuă a apei
	Raportul recomandat de masculi și femele pentru reproducere	2:1 (sau eliberare de gameți în masă)
Bazine pentru eliberarea de gameți		de exemplu, bazine de 4 l echipate cu un grilaj din oțel la fund și plante artificiale ca stimulent pentru eliberarea de gameți; încălzitoare externe sau eliberare de gameți în masă în cadrul bazinelor de întreținere
Structura și aspectul ouălor		Corion stabil (*adică* foarte transparent, ne-lipicios, diametru ~ 0,8-1,5 mm)
Rata de reproducere		O femelă matură depune cel puțin 50-80 de ouă pe zi. În funcție de sușă, ratele de depunere a ouălor pot fi considerabil mai mari. Rata de fertilizare trebuie să fie ≥ 70 %. Pentru peștii care eliberează gameți pentru prima dată, ratele de fertilizare a ouălor pot fi mai mici primele dăți.
Tipul testului		Reînnoire statică, semi-statică, în regim dinamic, 26 ±1°C, camere de testare condiționate la 24 de ore (de exemplu, plăci cu 24 de godeuri cu 2,5-5 ml per cavitate)

▼M7

Apendicele 3

DEZVOLTAREA NORMALĂ LA PEȘTELE-ZEBRĂ LA 26 °C

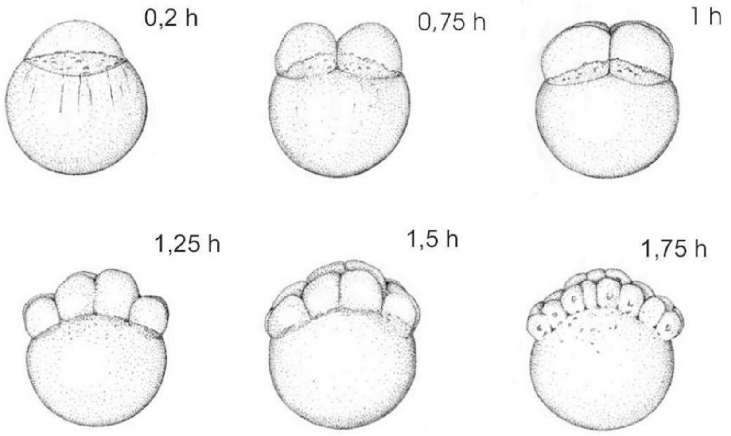


Figura 1: Stadii selectate ale dezvoltării timpurii la peștele-zebră (Danio rerio) 0,2-1,75 ore după fertilizare (din Kimmet et.al., 1995, (35)). Succesiunea în timp a dezvoltării normale poate fi utilizată pentru diagnosticarea fertilizării și a viabilității ouălor (a se vedea punctul 26: Selecția de ouă fertilizate).

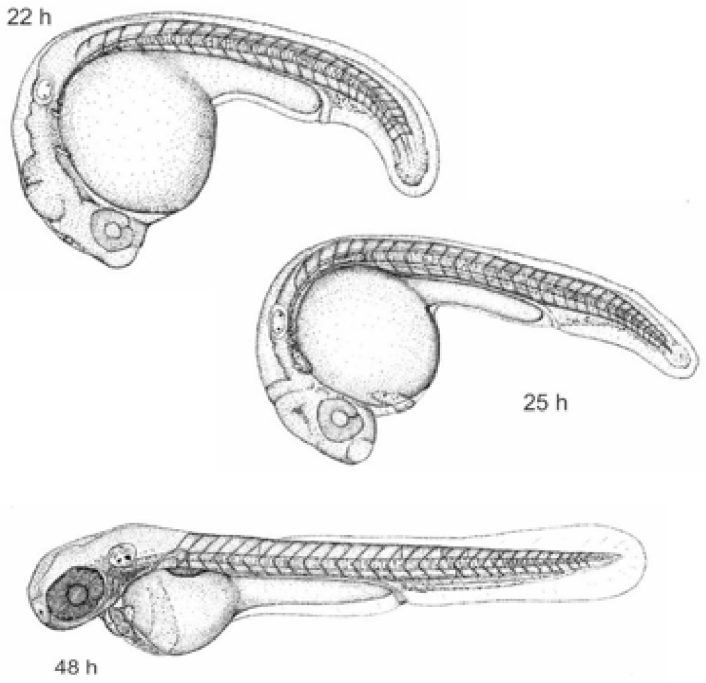


Figura 2: Stadii selectate din dezvoltarea târzie a peștelui-zebră (Danio rerio) (embrion fără corion pentru a optimiza vizibilitatea): 22 – 48 ore după fertilizare (din Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7

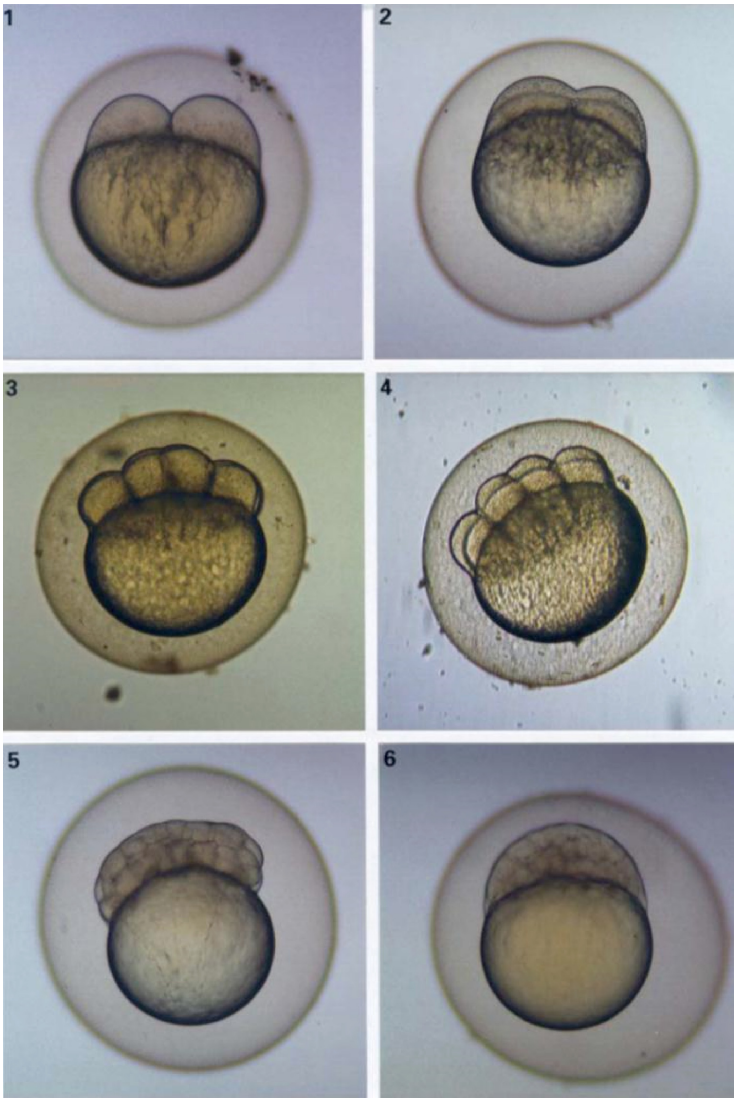


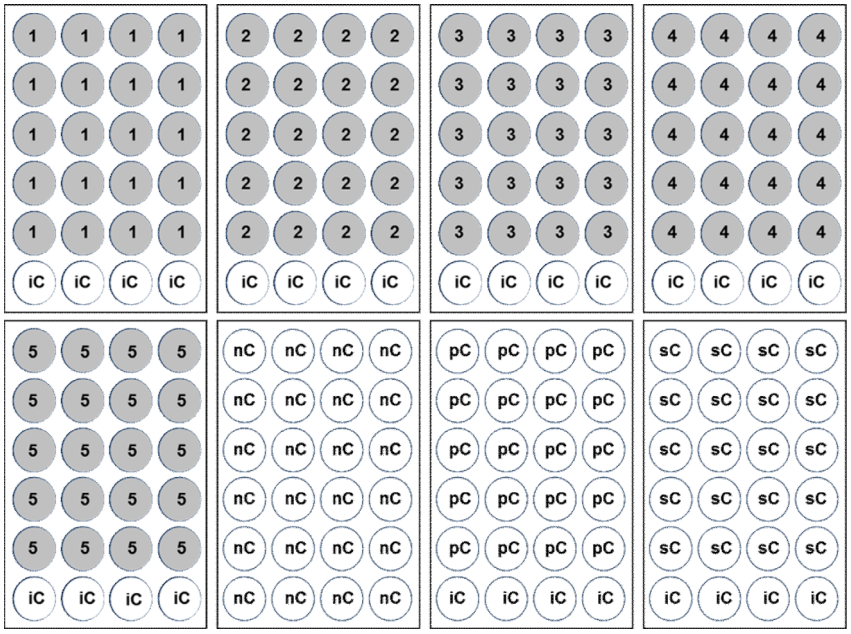
Figura 3: Dezvoltarea normală a embrionilor de pește-zebră (Danio rerio): (1) 0,75 h, stadiul diviziunii în 2 celule; (2) 1 h, stadiul diviziunii în 4 celule; (3) 1,2 h, stadiul diviziunii în 8 celule; (4) 1,5 h, stadiul diviziunii în 16 celule; (5) 4,7 h, începutul epiboliei; (6) 5,3 h, aprox. 50 % epibolie (din Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Apendicele 4

Figura 1

Dispunerea plăcilor cu 24 de godeuri



1-5 = cinci concentrații de testare/substanță chimică;

Mn = control negativ (apa de diluție);

iC = control intern reprezentat de placă

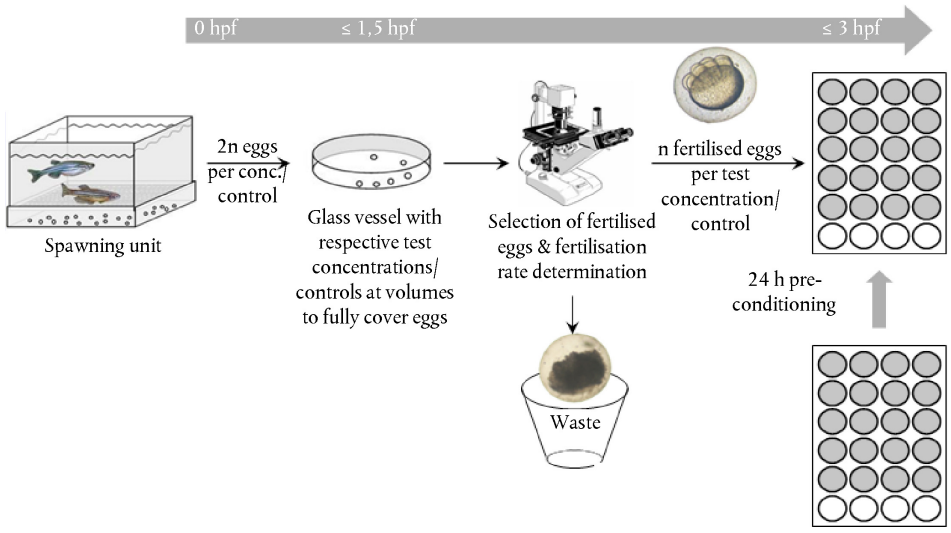
Mp = control pozitiv (3,4-DCA 4mg/l);

Ms = control solvent

▼M7

Figura 2

Schema procedurii testului de toxicitate acută pe embrionii de pește-zebră (de la stânga la dreapta) producția de ouă, colectarea de ouă, pre-expunere imediat după fertilizare în vase de sticlă, selecția de ouă fertilizate cu un microscop inversat sau binocular și distribuția de ouă fertilizate în plăci cu 24 de godeuri preparate cu concentrații de testare/de control, n = numărul de ouă necesare pentru fiecare concentrație de testare/de control (aici, 20), HPF = ore post-fertilizare.



▼M7

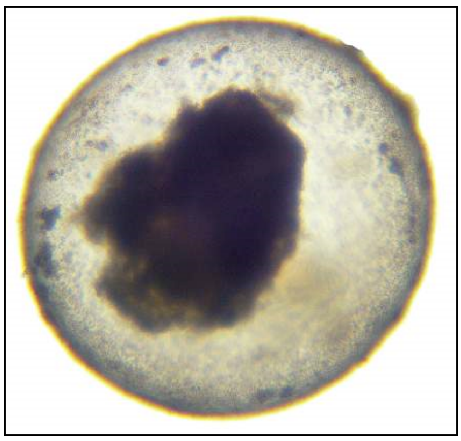
Apendicele 5

ATLASUL PUNCTELOR FINALE LETALE PENTRU TESTUL DE TOXICITATE ACUTĂ PE EMBRIONII DE PEȘTE-ZEBRĂ

Următoarele puncte finale apicale indică toxicitate acută și, prin urmare, decesul peștilor. *coagularea embrionului, lipsa desprinderii cozii, lipsa formării de somite și lipsa bătăilor inimii.* Au fost selectate următoarele micrografii pentru a ilustra aceste puncte finale:

Figura 1

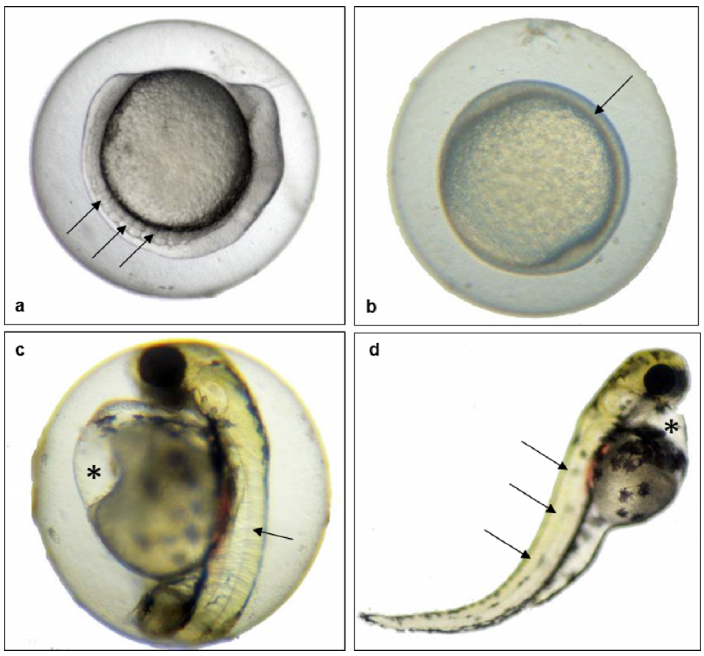
Coagularea embrionului



În lumină naturală puternică, embrionii de pește-zebră coagulați prezintă o varietate de incluziuni intransparente.

Figura 2

Lipsa formării de somite

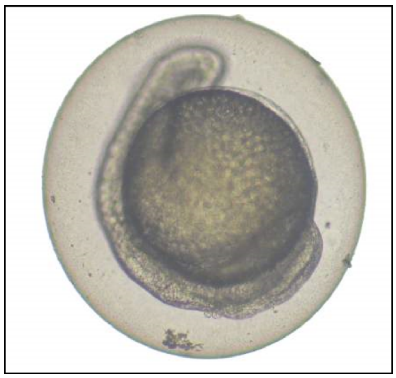


▼M7

Deși prezintă deja întârzieri în dezvoltare cu aproximativ 10 ore, embrionul de pește-zebră cu vârsta de 24 de ore în (a) prezintă somite bine dezvoltate (→), în timp ce embrionul de la (b) nu prezintă niciun semn de formare de somite (→). Deși prezintă un edem pronunțat al sacului vitelin (*), embrionul de pește-zebră cu vârsta de 48 de ore prezintă în (c) o formare distinctă de somite (→), în timp de embrionul de pește-zebră cu vârsta de 96 de ore descris în (d) nu prezintă niciun semn de formare de somite (→). A se nota, de asemenea, curbura spinală (scolioză) și edemul pericardic la embrionul prezentat în (d).

Figura 3

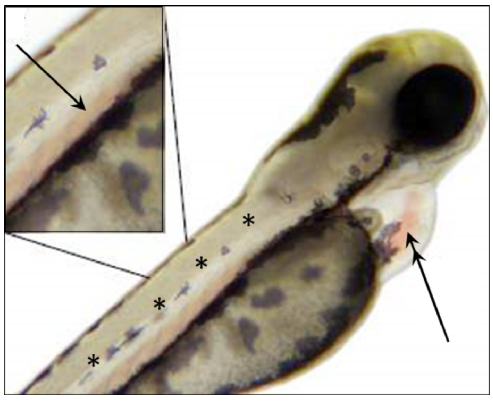
Nedesprinderea mugurelui terminal, vedere laterală



(a: → embrion de pește-zebră cu vârsta de 96 de ore). A se remarca, de asemenea, lipsa mugurelui ocular (*).

Figura 4

Absența bătăilor inimii



Absența bătăilor inimii este, prin definiție, greu de ilustrat prin micrografie. Absența bătăilor inimii este indicată prin lipsa convulsiilor inimii (săgeată dublă). Imobilitatea celulelor sangvine în, de exemplu, aorta abdominală (→) nu este un indicator pentru lipsa bătăilor inimii. A se remarca, de asemenea, lipsa formării de somite în acest embrion (*, omogen mai degrabă decât apariția segmentară a țesuturilor musculare). Durata de observare pentru a înregistra absența bătăilor inimii trebuie să fie de cel puțin un minut, cu o mărire de cel puțin de 80 de ori.

▼M7

C.50. TEST DE TOXICITATE PE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* FĂRĂ SEDIMENT

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 238 (2014). Aceasta este concepută pentru a evalua toxicitatea substanțelor chimice asupra *Myriophyllum spicatum*, o plantă acvatică dicotiledonată submersă, specie din familia peniței. Acesta se bazează pe o metodă de testare existentă ASTM (1) modificată într-un sistem de testare fără sedimente (2) pentru a estima ecotoxicitatea intrinsecă a substanțelor chimice de testare (independent de raportul distribuție-comportament a substanței chimice de testare dintre apă și sediment). Un sistem de testare fără sediment are o complexitate analitică scăzută (doar în faza apoasă), iar rezultatele pot fi analizate în paralel și/sau comparativ cu cele obținute în urma testului pe *Lemna sp*. (3); în plus, condițiile sterile necesare permit menținerea efectelor microorganismelor și algelor (asimilarea /deteriorarea substanței etc.) la un nivel cât mai scăzut posibil. Acest test nu înlocuiește alte teste de toxicitate acvatică, ci mai degrabă le completează pentru a permite astfel o evaluare cât mai completă a riscurilor și pericolelor pentru plantele acvatice. Metoda de testare a fost validată printr-un test circular (4).

2. Sunt prezentate detalii privind testarea cu reînnoirea (semistatică) și fără reînnoirea (statică) a soluției de testare. În funcție de obiectivele testului și de cerințele de reglementare, se recomandă utilizarea metodei semistatice, de exemplu pentru substanțe care se pierd cu rapiditate din soluție ca urmare a volatilizării, a adsorbției, a hidrolizei, a fotodegradării, a precipitării sau a biodegradării. Alte orientări sunt disponibile în referința (5). Această metodă de testare se aplică substanțelor pentru care metoda de testare a fost validată ([a se vedea detalii în raportul testului circular (4)] sau formulelor, sau amestecurilor cunoscute; în cazul în care se testează un amestec, constituenții acestuia trebuie identificați și cuantificați pe cât posibil. Metoda de testare cu *Myriophyllum spicatum* fără sediment completează testul de toxicitate cu *Myriophyllum spicatum* în sistem apă-sediment. Înainte de utilizarea acestei metode de testare pentru testarea unui amestec destinat unui scop de reglementare, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, motivele pentru care aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

PRINCIPIUL TESTULUI

3. Culturile de plante cu creștere continuă de *Myriophyllum spicatum* (numai în mediu Andrews modificat, a se vedea apendicele 2) se lasă să crească în monoculturi, în concentrații diferite ale substanței de testare, pentru o perioadă de 14 zile într-un sistem de testare fără sediment. Obiectivul testului este de a cuantifica efectele substanței chimice asupra creșterii vegetative în această perioadă, pe baza evaluărilor variabilelor de măsurare selectate. Creșterea lungimii lăstarilor, a ramurilor laterale și a rădăcinilor, precum și dezvoltarea greutății în stare proaspătă și a greutății uscate a vârtejurilor constituie variabilele de măsurare. De asemenea, se ține cont de variațiile calitative distinctive ale organismelor de testare, cum ar fi deformarea sau cloroza și necroza sugerate de îngălbenire, înălbire sau colorarea în maro. Pentru cuantificarea efectelor substanțelor chimice, creșterea în soluțiile de testare se compară cu cea a probelor de control, iar concentrația care provoacă o inhibare specificată de x % a creșterii este determinată și exprimată ca ECx: „x” poate avea orice valoare în funcție de cerințele de reglementare, de exemplu, EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Trebuie remarcat faptul că estimările valorilor EC_{10} și EC_{20} sunt fiabile și adecvate doar în cadrul testelor în care coeficienții de variație la plantele de control se situează sub nivelul estimat al efectului, și anume coeficienții de variație trebuie să fie < 20 % pentru o estimare solidă a unei EC_{20}.

4. Se vor determina atât rata medie specifică de creștere (estimată pe baza evaluărilor lungimii lăstarului principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare), cât și randamentul (estimat pe baza creșterii lungimii lăstarului

▼M7

principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare) la plantele tratate și netratate. Viteza specifică de creștere (r) și randamentul (y) sunt utilizate ulterior pentru a determina E_rC_x (de exemplu, E_rC_{10}, E_rC_{20},E_rC_{50}) și, respectiv, E_yC_x (de exemplu, E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. În plus, concentrația cea mai mică la care este observat un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

6. O metodă analitică având o sensibilitate adecvată pentru cuantificarea substanței chimice de testare în mediul de testare trebuie să fie disponibilă. Informațiile privind substanța chimică de testare care se pot dovedi utile pentru stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, puritatea și impuritățile, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, constanta de disociere (pK_a), coeficientul de partiție octanol/apă (K_{ow}), presiunea de vapori și biodegradabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt probabile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în perioada de testare. Aceasta va indica dacă este necesară adoptarea anumitor măsuri pentru limitarea unor astfel de pierderi. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței de testare sunt incerte, se recomandă ca acestea să fie evaluate în condițiile de testare, și anume mediul de creștere, temperatura și condițiile de iluminare care vor fi folosite la test.

7. Controlul pH-ului mediului de testare este deosebit de important, de exemplu în cazul testării unor metale sau substanțe instabile din punct de vedere hidrolitic. Îndrumări suplimentare privind substanțele de testare cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate într-un document de orientare al OCDE (5).

VALIDITATEA TESTULUI

8. Pentru ca testul să fie valid, perioada de duplicare a lungimii lăstarului principal din proba de control trebuie să fie mai mică de 14 zile. Folosind mediile și condițiile de testare descrise în această metodă de testare, acest criteriu poate fi îndeplinit prin utilizarea unui test semistatic sau static.

9. Coeficientul mediu de variație pentru randament bazat pe măsurători ale greutății lăstarilor în stare proaspătă (și anume, de la începutul și până la sfârșitul testului) și variabilele suplimentare de măsurare (a se vedea punctul 37) în culturile de control nu trebuie să depășească 35 % între duplicate.

10. Mai mult de 50 % din numărul probelor duplicat din grupul de control se păstrează sterile pe parcursul perioadei de expunere de 14 zile, ceea ce înseamnă lipsa în mod evident a contaminării cu alte organisme precum alge, ciuperci și bacterii (soluție clară). *Notă*: Orientări privind modul de evaluare a sterilității sunt prezentate în raportul testului circular (4).

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

11. Substanța (substanțele) chimică(e) de referință, cum ar fi 3,5-diclorfenol folosit în testul circular (4), poate (pot) fi testată(e) ca metodă de verificare a procedurii de testare; pe baza datelor testului circular, media valorilor EC_{50} pentru 3,5-DCF pentru variabile de răspuns diferite (a se vedea punctele 37-41 din această metodă de testare) se situează între 3,2 mg/l și 6,9 mg/l (a se vedea raportul testului circular pentru detalii privind intervalul de încredere pentru valorile respective). Este recomandabil ca o substanță chimică de referință să fie testată cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară mai puțin frecvent, în paralel cu determinarea toxicității unei substanțe chimice de testare.

▼M7

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

12. Toate echipamentele care intră în contact cu mediile de testare trebuie să fie confecționate din sticlă sau alt material chimic inert. Recipientele de sticlă folosite pentru cultură și testare trebuie să fie curățate de contaminanții chimici care se pot infiltra în mediul de testare și trebuie să fie sterile. Vasele de testare trebuie să fie suficient de lungi pentru ca lăstarii din vasele de control să crească în faza apoasă fără a atinge suprafața mediului de testare la sfârșitul testului. Se recomandă tuburi din sticlă borosilicată cu pereți groși fără margine ridicată, cu un diametru interior de aproximativ 20 mm și o lungime de aproximativ 250 mm, cu capace de aluminiu

13. Întrucât mediul modificat Andrews conține zaharoză (care stimulează creșterea ciupercilor și a bacteriilor), soluțiile de testare trebuie să fie preparate în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer încălzit (210 °C) timp de 4 ore sau în autoclavă timp de 20 minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse unui tratament la flacără pe un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

14. Culturile și vasele de testare nu se păstrează în același loc. Această condiție poate fi îndeplinită prin folosirea unor încăperi, incubatoare sau camere de creștere care reproduc condițiile de mediu separate. Iluminarea și temperatura trebuie să fie controlabile și menținute la un nivel constant.

Organismul de testare

15. *Myriophyllum spicatum* – o plantă acvatică dicotiledonată submersă – este o specie din familia peniței de apă. Între lunile iunie și august, flori discrete roz-albe își fac apariția la suprafața apei. Plantele sunt înrădăcinate în sol prin intermediul unui sistem de rizomi viguroși și pot fi găsite în întreaga emisferă nordică în ape eutrofice, dar nepoluate și mai calcaroase cu substrat noroios. *Myriophyllum spicatum* preferă apa dulce, dar se găsește și în apă salmastră.

16. Pentru testul de toxicitate fără sediment, sunt necesare plante sterile. În cazul în care laboratorul de testare nu are culturi obișnuite de *Myriophyllum spicatum*, plante de testare sterile pot fi obținute de la un alt laborator sau pot proveni de pe teren (nesterile) sau de la un furnizor comercial; dacă plantele provin de pe teren, se va lua în considerare o verificare taxonomică a speciei. Dacă sunt colectate de pe teren sau provin de la un furnizor comercial, plantele trebuie sterilizate (1) și menținute în cultură în același mediu ca cel folosit pentru testare timp de cel puțin opt săptămâni înainte de utilizare. Terenurile de pe care s-au colectat culturile inițiale trebuie să fie lipsite de surse evidente de contaminare. Trebuie luate măsuri de precauție pentru a se asigura că se obține specia corectă atunci când se colectează *Myriophyllum spicatum* de pe teren, în special în regiunile în care aceasta se poate încrucișa cu alte specii de *Myriophyllum*. Dacă plantele au fost obținute de la un alt laborator, se vor menține în condiții similare timp de cel puțin trei săptămâni. Sursa plantelor și a speciilor folosite ca material pentru testare se raportează întotdeauna.

17. Calitatea și uniformitatea plantelor folosite pentru testare vor avea o influență semnificativă asupra rezultatului testului și, prin urmare, se vor selecta cu atenție. Se vor folosi plante tinere, cu creștere rapidă, fără leziuni sau decolorări vizibile (cloroză). Detalii privind pregătirea organismelor de testare sunt prezentate în apendicele 4.

Cultivarea

18. În scopul reducerii frecvenței de întreținere a culturii (de exemplu, în situațiile în care nu sunt prevăzute teste cu *Myriophyllum* pentru o anumită perioadă), culturile pot fi menținute în condiții de iluminare și temperatură scăzută (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Detalii privind culturile sunt prezentate în apendicele 3.

▼M7

19. Cu cel puțin 14-21 de zile înainte de testare, se transferă un număr suficient de organisme de testare în condiții aseptice într-un mediu steril proaspăt și se cultivă timp de 14-21 de zile în condiții similare cu cele ale testului drept precultură. Detalii privind prepararea unei preculturi sunt prezentate în apendicele 4.

Mediul de testare

20. Pentru testarea cu *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment, se recomandă un singur mediu nutritiv, conform descrierii din apendicele 2. O modificare a mediului Andrews este recomandată pentru cultura și testarea cu *Myriophyllum spicatum*, conform descrierii din referința (1). Din cinci soluții stoc nutritive preparate separat cu adaos de 3 % zaharoză, se va pregăti mediul Andrews modificat. Detalii cu privire la prepararea mediului sunt prezentate în apendicele 2.

21. Pentru a se obține soluțiile de testare (prin diluare, după caz), este necesar un mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori. Compoziția acestui mediu este prezentată în apendicele 2.

Soluții de testare

22. Soluțiile de testat se prepară de regulă prin diluarea unei soluții stoc. Soluțiile stoc ale substanței chimice de testare se prepară de preferință prin dizolvarea substanței în apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată). Adăugarea de nutrienți se va realiza prin utilizarea unui mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori.

23. Soluțiile stoc ale substanței chimice de testare pot fi sterilizate în autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute sau prin filtrare sterilă, cu condiția ca sterilizarea tehnică utilizată să nu denaturizeze substanța chimică de testare. Soluțiile de testare pot fi preparate, de asemenea, în apă demineralizată sau mediu steril, în condiții de sterilitate. Termostabilitatea și adsorbția pe suprafețe diferite trebuie luate în considerare în momentul alegerii procedurii de sterilizare a soluțiilor stoc ale substanței chimice de testare. Din acest motiv, se recomandă ca soluțiile stoc să fie preparate în condiții sterile, și anume prin utilizarea de materiale sterile pentru dizolvarea substanței chimice de testare în condiții sterile (de exemplu, sterilizarea la flacără, hote cu flux laminar etc.) în apă sterilă. Această tehnică de preparare a soluțiilor stoc sterile este valabilă atât pentru substanțe, cât și pentru amestecuri.

24. Concentrația maximă de testare a substanței chimice de testare nu trebuie să depășească în mod normal solubilitatea acesteia în apă în condițiile de testare. Pentru substanțele chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrată sau dispersia substanței chimice folosind un solvent sau un agent de dispersie organic, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță de testare în mediul de testare și pentru a favoriza dispersia și dizolvarea acesteia. Se vor depune toate eforturile pentru a evita folosirea unor astfel de materiale. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, solvenții obișnuiți care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l includ acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau un agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la minimum (≤ 100 µl/l), iar toate tratamentele și probele de control trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau de agent de dispersie. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prezentate în referința (5).

Grupurile de testare și de control

25. Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței chimice de testare asupra *Myriophyllum spicatum* în urma unui test de stabilire a intervalului va permite alegerea concentrațiilor potrivite de testare. În testul final de

▼M7

stabilire a toxicității, trebuie să existe în mod normal între cinci (precum în cadrul testului de inhibare a creșterii *Lemna,* capitolul C.26 din prezenta anexă) și șapte concentrații de testare dispuse în serie geometrică; acestea trebuie selectate astfel încât valorile NOEC și EC_{50} să fie cuprinse în intervalul concentrațiilor de testare (a se vedea mai jos). Se preferă ca factorul de separare între concentrațiile de testare să nu depășească 3,2, dar se poate folosi o valoare mai mare în cazul în care curba concentrație-răspuns este plată. Utilizarea a mai puțin de cinci concentrații trebuie justificată. Se folosesc cel puțin cinci probe duplicat pentru fiecare concentrație de testare.

26. La stabilirea intervalului concentrațiilor de testare (pentru testul de stabilire a intervalului și/sau testul final de stabilire a toxicității), trebuie să se rețină următoarele:

Pentru determinarea unei EC_x, concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea EC_x în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează EC_{50}, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie mai mare decât valoarea EC_{50}. Dacă valoarea EC_{50} se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă;

Dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC, concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută, astfel încât creșterea să nu fie cu mult mai mică decât cea a probei de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare astfel încât creșterea să fie cu mult mai mică decât cea în proba de control. Dacă nu este cazul, testul se va repeta folosind un interval diferit de concentrații (cu excepția cazului în care cea mai mare concentrație se află la limita solubilității sau la concentrația-limită maximă cerută, de exemplu 100 mg/l).

27. Fiecare test trebuie să includă probe de control constând în același mediu nutritiv, același organism de testare (alegerea materialului vegetal cât mai omogen posibil, ramuri laterale proaspete din preculturi, scurtate la 2,5 cm de la bază), aceleași condiții ambientale și proceduri precum cele din vasele de testare, dar fără substanța chimică de testare. Dacă se folosește un solvent sau agent de dispersie suplimentar, se va include un tratament suplimentar de control cu solventul/agentul de dispersie prezent în aceeași concentrație cu cea din vasele de testare cu substanța chimică de testare. Numărul vaselor de control duplicate (și vasele cu solvenți, dacă este cazul) trebuie să fie de cel puțin zece.

28. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, conceptul de testare poate fi modificat în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație. Cu toate acestea, în orice caz, numărul de probe duplicat de control trebuie să fie de cel puțin zece.

Expunere

29. Ramurile laterale proaspete din precultură scurtate la 2,5 cm de la bază sunt poziționate aleatoriu în vasele de testare în condiții aseptice; fiecare vas de testare trebuie să conțină o ramură laterală de 2,5 cm care să prezinte un meristem apical la un capăt. Materialul vegetal ales trebuie să aibă aceeași calitate în fiecare vas de testare.

30. Vasele de testare vor fi poziționate aleatoriu în incubator pentru a se minimiza influența diferențelor spațiale de intensitate a luminii sau de temperatură. Este necesară, de asemenea, o dispunere fixă sau aleatorie a vaselor (sau o repoziționare mai frecventă) atunci când se efectuează observații.

31. Dacă un test preliminar de stabilitate arată că nu poate fi menținută concentrația substanței de testare (concentrația măsurată scade sub 80 % din concentrația măsurată inițial) pe durata perioadei de testare (14 zile), se recomandă un test semistatic. În acest caz, plantele se expun unor soluții proaspăt preparate de testare și de control cel puțin o dată în timpul testului

▼M7

(de
exemplu, ziua a 7-a). Frecvența expunerii la un mediu proaspăt va depinde de stabilitatea substanței de testare; pentru menținerea concentrațiilor cât mai aproape de nivelul constant în cazul substanțelor foarte instabile sau volatile, poate fi necesară o frecvență mai mare.

32. Scenariul de expunere prin aplicare foliară (pulverizare) nu este inclus în această metodă de testare.

Condițiile de testare

33. Se va folosi o lumină fluorescentă albă, caldă și/sau rece pentru a asigura o intensitate luminoasă cuprinsă în intervalul 100-150 μ E m^{-2} s^{-1} atunci când este măsurată în radiație activă fotosintetică (400-700 nm) în puncte aflate la distanțe egale de sursa de lumină cu fundul vaselor de testare (echivalent cu 6000 – 9000 lucsi) și un ciclu de lumină și întuneric de 16:8 ore. Metoda de detectare și de măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va afecta valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare) și senzorii „cosinus” (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.

34. Temperatura din vasele de testare trebuie sa fie de 23 ± 2 °C. Se va acorda o atenție sporită devierii pH-ului în cazuri speciale, cum ar fi în cazul testării de substanțe chimice instabile sau de metale; pH-ul trebuie să rămână în intervalul 6-9. Pentru alte orientări, a se vedea referința (5).

Durată

35. Testul se încheie după 14 zile de la transferul plantelor în vasele de testare.

Măsurători si determinări analitice

36. La începutul testului, lungimea lăstarului principal al organismului de testare este de 2,5 cm (a se vedea punctul 29); acesta este măsurat cu o riglă (a se vedea apendicele 4) sau pe baza analizei fotografiei sau a imaginii. Lungimea lăstarului principal al organismului de testare aparent normal sau anormal trebuie sa fie stabilită la începutul testului, cel puțin o dată în timpul perioadei de 14 zile, precum și la sfârșitul testului. Notă: Ca o alternativă în cazul în care nu există o analiză a imaginilor, dacă bancul de lucru este sterilizat înainte de adăugarea plantelor în vasele de testare, se poate utiliza, de asemenea, o riglă sterilă pentru a măsura lungimea lăstarului principal la începutul și în timpul testului. Se înregistrează modificările în dezvoltarea plantei, de exemplu deformări ale lăstarilor, aspectul, indicațiile de necroză, clorază sau pierderea de flotabilitate, precum și cele privind lungimea și aspectul rădăcinii. Se înregistrează, de asemenea, caracteristicile semnificative ale mediului de testare (de exemplu, prezența de material nedizolvat, creșterea de alge, ciuperci și bacterii în vasele de testare).

37. Pe lângă determinările lungimii lăstarului principal, se evaluează, de asemenea, efectele substanței chimice de testare asupra a trei (sau mai multe) dintre următoarele variabile de măsurare:

i. Lungimea totală a ramurilor laterale

ii. Lungimea totală a lăstarilor

iii. Lungimea totală a rădăcinii

iv. Greutatea în stare proaspătă

v. Greutate uscată

vi. Numărul de vârtejuri

▼M7

Nota 1: Observațiile făcute în timpul testului de stabilire a intervalului pot contribui la selectarea măsurătorilor suplimentare relevante dintre cele șase variabile enumerate mai sus.

Nota 2: Se recomandă determinarea greutății în stare proaspătă și a greutății uscate (parametri iv și v).

Nota 3: Datorită faptului că zaharoza și lumina (expunerea rădăcinilor la lumină în timpul testului) ar putea să influențeze transportatorii de auxină (hormon de creștere a plantelor) și că unele substanțe chimice ar putea să aibă un mod de acțiune de tipul auxinei, incluziunea punctelor finale legate de rădăcină (parametrul iii) este discutabilă.

Nota 4: Rezultatele testului circular arată coeficienți mari de variație (> 60 %) pentru lungimea totală a ramurilor laterale (parametrul i). Lungimea totală a ramurilor laterale este cuprinsă în orice caz în măsurarea lungimii totale a lăstarilor (parametrul ii) care prezintă coeficienți de variație mai acceptabili de < 30 %.

Nota 5: Pe baza considerațiilor de mai sus, principalele puncte finale de măsurare recomandate sunt: lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată (parametrii ii, iv și v); parametrul vi – numărul vârtejurilor – va fi stabilit de cel care efectuează testul.

38. Lungimea lăstarului principal și numărul de vârtejuri prezintă un avantaj în sensul că pot fi determinate pentru fiecare vas de testare și de control la începutul, în timpul și la sfârșitul testului pe baza analizei fotografiilor și a imaginilor, deși se poate folosi, de asemenea, o riglă (sterilă).

39. Lungimea totală a ramurilor, lungimea totală a rădăcinilor (ca sumă a tuturor ramurilor laterale și a rădăcinilor) și lungimea totală a lăstarilor (ca sumă a lungimii lăstarului principal și a lungimii totale a ramurilor laterale) pot fi măsurate cu o riglă la sfârșitul expunerii.

40. Greutatea în stare proaspătă și/sau greutatea uscată trebuie determinate la începutul testului pe baza unui eșantion din precultură reprezentativ pentru substanța folosită la începutul testului, iar la sfârșitul testului, utilizând materialul vegetal din fiecare vas de testare și de control.

41. Lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor pot fi determinate după cum urmează:

i. Lungimea totală a ramurilor laterale: Lungimea ramurilor laterale poate fi determinată prin măsurarea tuturor ramurilor laterale cu o riglă la sfârșitul perioadei de expunere. Lungimea totală a ramurilor laterale reprezintă suma tuturor ramurilor laterale din fiecare vas de testare și de control.

ii. Lungimea totală a lăstarilor: Lungimea lăstarului principal poate fi determinată prin analiza imaginilor sau folosind o riglă. Lungimea totală a lăstarilor reprezintă suma lungimii totale a ramurilor laterale și a lungimii lăstarului principal din fiecare vas de testare și de control la sfârșitul perioadei de expunere.

iii. Lungimea totală a rădăcinii: Lungimea rădăcinii poate fi determinată prin măsurarea tuturor rădăcinilor cu ajutorul unei rigle la sfârșitul perioadei de expunere. Lungimea totală a rădăcinii este suma tuturor rădăcinilor din fiecare vas de testare și de control.

iv. Greutatea în stare proaspătă: Greutatea în stare proaspătă poate fi determinată prin cântărirea organismelor de testare la sfârșitul perioadei de

▼M7

expunere. Toate materiale vegetale din fiecare vas de testare și de control vor fi spălate cu apă distilată și uscate ușor cu hârtie din celuloză. După această măsură preliminară, greutatea în stare proaspătă se va determina prin cântărire. Biomasa de la începutul testului (greutate în stare proaspătă) se determină pe baza unui eșantion din organismele de testare luate din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare.

v. Greutatea uscată: După efectuarea pregătirilor pentru determinarea greutății în stare proaspătă, organismele de testare se usucă la 60 °C până la o greutate constantă. Această masă reprezintă greutatea uscată. Biomasa de la începutul testului (greutatea uscată) este determinată pe baza unui eșantion din organismele de testare din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare.

vi. Numărul vârtejurilor: Vor fi numărate toate vârtejurile de-a lungul lăstarului principal.

Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice

42. Dacă se folosește un concept de test static, pH-ul fiecărui tratament se măsoară la începutul și la sfârșitul testului. Dacă se folosește un concept de test semistatic, pH-ul se măsoară în fiecare lot de soluție de testare „proaspătă” înainte de fiecare reînnoire, precum și în soluțiile „uzate” corespunzătoare.

43. Intensitatea luminii se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte aflate la aceeași distanță de sursa de lumină ca și organismele de testare. Măsurătorile se fac cel puțin o dată în timpul testului. Temperatura mediului într-un vas înlocuitor menținut în condiții similare cu cele din încăperea, incubatorul sau camera de creștere se înregistrează cel puțin o dată pe zi (sau în mod continuu cu un înregistrator de date).

44. În timpul testului, concentrațiile substanței/substanțelor chimice de testare sunt determinate la intervale de timp adecvate. În testele statice, cerința minimă este de a determina concentrațiile la începutul și la sfârșitul testului.

45. În testele semistatice, în care nu se estimează menținerea concentrației substanței (substanțelor) chimice de testare în limita a ± 20 % din cea nominală, este necesar să se analizeze toate soluțiile de testare proaspăt preparate, precum și aceleași soluții la fiecare reînnoire. Cu toate acestea, pentru testele în care concentrațiile inițiale măsurate ale substanței (substanțelor) chimice de testare nu se situează în limita a ±20 % din cea nominală, dar unde se pot aduce dovezi suficiente care să indice repetabilitatea și stabilitatea concentrațiilor inițiale (și anume, în intervalul de 80-120 % din concentrațiile inițiale), determinările chimice se vor efectua doar la concentrațiile de testare cele mai mari și cele mai scăzute. În toate cazurile, determinarea concentrațiilor substanței chimice de testare trebuie efectuată doar în unul dintre vasele conținând probe duplicat la fiecare concentrație de testare (sau în conținutul vaselor grupate în funcție de proba duplicat).

46. Dacă se poate dovedi menținerea satisfăcătoare, pe toată durata testului, a concentrației substanței chimice de testare în limita a ± 20 % din cea nominală sau măsurată inițial, atunci analiza rezultatelor poate avea loc pe baza valorilor nominale sau măsurate inițial. Dacă abaterea de la concentrația nominală sau măsurată inițial nu se află în limita a ±20 %, este necesar ca analiza rezultatelor să se bazeze pe media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau pe modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare. (5)

Test la valori-limită

47. În anumite circumstanțe, de exemplu atunci când un test preliminar arată că substanța de testare nu are efecte toxice la concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare sau în cazul unei formulări până la limita sa de dispersie, se poate efectua un test la valori-limită care presupune o comparare a răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului (100 mg/l sau o concentrație

▼M7

egală cu limita solubilității). Se recomandă ca acest test să fie confirmat prin analiza concentrației de expunere. Pentru un test la valori-limită se aplică toate condițiile de testare și criteriile de validitate descrise anterior, cu excepția faptului că numărul de probe duplicat supuse tratamentului trebuie să fie dublu. Creșterea în grupul de control și în cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic pentru a compara mediile, de exemplu un test-t Student.

DATE ȘI RAPORTARE

Variabile de răspuns

48. Scopul testului este de a determina efectele substanței chimice de testare asupra creșterii vegetative a *Myriophyllum spicatum*. Această metodă de testare descrie două variabile de răspuns.

a) Viteza medie specifică de creștere: Această variabilă de răspuns este calculată pe baza schimbărilor logaritmice ale lungimii lăstarului principal și, în plus, pe baza schimbărilor logaritmice ale altor parametri de măsurare, și anume lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor în timp (exprimată pe zi) în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Notă: Pentru parametrul de măsurare exprimat de lungimea totală a ramurilor laterale și lungimea totală a rădăcinii, nu este posibilă calcularea vitezei medii specifice de creștere. La începutul testului, organismul de testare nu are ramuri laterale și nici rădăcini (bazate pe pregătirea din precultură); începând cu valoarea zero, calcularea vitezei medii specifice de creștere nu este definită.

b) Randament: Această variabilă de răspuns se calculează pe baza schimbărilor survenite în lungimea lăstarului principal și, în plus, pe baza schimbărilor survenite la alți parametri de măsurare – și anume, de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor, precum și la alți parametri dacă se consideră util – în probele de control și în fiecare grup de tratament până la sfârșitul testului.

49. Estimările de toxicitate trebuie să se bazeze pe lungimea lăstarului principal și alte trei variabile de măsurare (de exemplu, de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată, greutatea în stare proaspătă sau numărul de vârtejuri, a se vedea punctul 37 și notele 2, 4 și 5 la prezentul punct), întrucât unele substanțe chimice pot afecta alte variabile de măsurare considerabil mai mult decât lungimea lăstarului principal. Acest efect nu va putea fi detectat exclusiv în urma calculării lungimii lăstarului principal.

Viteza medie specifică de creștere

50. Viteza medie specifică de creștere pentru o anumită perioadă se calculează ca fiind creșterea logaritmică a variabilelor de creștere – lungimea lăstarului principal și trei variabile suplimentare de măsurare (lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul de vârtejuri) – folosind formula de mai jos pentru fiecare probă duplicat a probelor de control și a probelor supuse tratamentului:

$$\mu_{i-j} = \frac{\left(\ln(N_j) - \ln(N_i\right)}{t}$$

unde:

μ_{i-j}: viteza medie specifică de creștere de la momentul i la momentul j

N_i: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

N_j: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

t: perioada de timp de la i la j

▼M7

Pentru fiecare grup supus tratamentului și de control, se calculează o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările variației.

51. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimările variației. În plus, viteza de creștere pe secțiuni se evaluează în scopul evaluării efectelor substanței chimice de testare care se produc în timpul perioadei de expunere (de exemplu, prin verificarea curbelor de creștere transformate logaritmic).

52. Astfel, procentajul de inhibare a vitezei de creștere (Ir) se poate calcula pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarei formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

unde:

% Ir: procentajul de inhibare a vitezei medii specifice de creștere

μC: valoarea medie aμ în grupul de control

μT: valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

Randamentul

53. Efectele asupra randamentului se determină pe baza variabilei de măsurare, și anume lungimea lăstarului principal și a altor trei variabile suplimentare de măsurare (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri) prezente în fiecare vas de testare la începutul și la sfârșitul testului. În cazul greutății în stare proaspătă sau al greutății uscate, biomasa inițială se determină pe baza unui eșantion din organismele de testare prelevat din același lot folosit pentru inocularea vaselor de testare. Pentru fiecare concentrație de testare și probă de control, se calculează o valoare medie a randamentului în paralel cu estimările variației. Procentajul mediu de inhibare a randamentului (% I_y) poate fi calculat pentru fiecare grup supus tratamentului după cum urmează:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

unde:

% I_y: procentajul de reducere a randamentului

b_C: biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control

b_T: biomasa finală minus biomasa inițială în grupul supus tratamentului

Timp de duplicare

54. Pentru a determina timpul de duplicare (T_d) al lungimii lăstarului principal și aderarea la acest criteriu de validitate (a se vedea punctul 8), se folosește următoarea formulă cu date obținute din vasele de control:

$T_d = \ln 2/\mu$

Unde μ este viteza medie specifică de creștere, astfel cum a fost descrisă la punctele 50-52.

▼M7

Reprezentarea grafică a curbelor concentrație-răspuns

55. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentajului de inhibare a variabilei de răspuns (Ir sau Iy calculată conform descrierii de la punctul 53) și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

Estimarea EC_x

56. Estimările EC_x trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x), cât și pe randament (E_yC_x), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe lungimea lăstarului principal și posibil pe variabile suplimentare de măsurare (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri). Aceasta se justifică deoarece există substanțe chimice care au un impact diferit asupra lungimii lăstarului principal și asupra altor variabile de măsurare. Parametrii de toxicitate doriți sunt, prin urmare, patru valori de EC_x pentru fiecare nivel de inhibare x calculat: E_rC_x (lungimea lăstarului principal); E_rC_x (de preferință lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri); E_yC_x (lungimea lăstarului principal); și E_yC_x (de preferință lungimea lăstarului principal, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată, numărul de vârtejuri).

57. Se va nota că valorile EC_x calculate folosind cele două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență este recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în cele mai multe cazuri mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) – în cazul în care se aderă la condițiile de testare ale prezentei metode de testare – datorită bazei matematice a abordărilor respective. Această diferență nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic.

Proceduri statistice

58. Obiectivul este de a se obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în unități probit, logit sau Weibull (7), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile regulate. Atunci când se apropie de zero sau inhibiție totală, aceste inexactități se pot amplifica prin transformare, interferând cu analiza (7). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se folosesc în cazul datelor binare (de exemplu, date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a reflecta datele privind viteza de creștere și randamentul. Procedurile specifice pentru determinarea valorilor EC_x pe baza datelor continue se regăsesc în referințele (8) (9) (10).

59. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor ECx. Dacă este posibil, se determină limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare. Concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supuse tratamentului.

60. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute, de asemenea, folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (10), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.

61. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor de tratare folosind tehnici de analiză a variației (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară ulterior cu media probei de control folosind o metodă de comparare multiplă adecvată sau de testare a tendinței. Testul lui Dunnett sau testul lui Williams pot fi utile în acest sens (12) (13) (14) (15) (16). Este necesar să se evalueze dacă ipoteza ANOVA de omogenitate a variației se verifică. O astfel de evaluare se poate efectua grafic sau printr-un test formal (15). Teste adecvate sunt cele ale lui Levene sau Bartlett. Neîndeplinirea ipotezei de omogenitate a variațelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor Dacă eterogenitatea

▼M7

varianței este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analizarea prin metode precum testele Jonkheere regresive de stabilire a tendinței. Îndrumări suplimentare privind determinarea NOEC sunt prezentate în referința (10).

62. Progresele științifice recente au condus la recomandarea de a renunța la conceptul de NOEC și de a-l înlocui cu estimări punctuale ale EC_x bazate pe regresie. Nu a fost stabilită o valoare adecvată a x pentru acest test cu *Myriophyllum*. Cu toate acestea, un interval de 10-20 % pare a fi adecvat (în funcție de variabilele de răspuns alese) și, de preferat, se raportează atât EC_{10}, și $EC_{20,}$ cât și limitele lor de încredere.

Raportare

63. Raportul de testare include următoarele:

Substanța chimică testată

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanțe multi-constituent, UVCB sau amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizate prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), numărul aparițiilor și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specia de testare:

— Denumire științifică și sursa.

Condițiile de testare

— Procedura de testare folosită (statică sau semistatică).

— Data de începere a testului și durata acestuia.

— Mediul de testare.

— Descrierea conceptului experimental: vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, lungimea lăstarului principal per vas de testare la începutul testului.

— Concentrațiile de testare (nominale și măsurate corespunzător) și numărul de duplicate per concentrație.

— Metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie.

— Temperatura în timpul testului.

— Sursa de lumină, intensitatea luminii și omogenitatea.

— Valorile pH-ului mediilor de testare și de control.

— Metoda de analiză a substanței chimice de testare cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, deviații standard sau limite de încredere ale analizelor).

▼M7

— Metode de determinare a lungimii medii a lăstarilor și a altor variabile de măsurare, de exemplu lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.

— Starea culturii (sterilă sau nesterilă) din fiecare vas de testare și de control, cu ocazia fiecărei observări.

— Orice abatere de la această metodă de testare.

Rezultate

— Date brute: lungimea lăstarului principal și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control cu ocazia fiecărei observații și cu ocazia analizei.

— Media și abaterile standard pentru fiecare variabilă de măsurare.

— Curbele de creștere pentru fiecare variabilă de măsurare.

— Variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat.

— Reprezentarea grafică a relației concentrație/efect.

— Estimări ale punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, de exemplu EC_{50}, $EC_{10,}$ EC_{20} și intervalele de încredere aferente. Dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora.

— Dacă s-a folosit ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența cea mai puțin semnificativă);

— Orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;

— Orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observările soluțiilor de testare;

— Discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(3) Capitolul C.26 din prezenta anexă*: Lemna sp., test de inhibare a creșterii.*

(4) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Capitolul C.51 din prezenta anexă: Test de toxicitate asupra *Myriophyllum spicatum* într-un sistem apă-sediment.

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Apendicele 1

DEFINIȚII

Biomasă înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezente într-o populație. În acest test, biomasa este suma lăstarului principal, a tuturor ramurilor laterale și a tuturor rădăcinilor.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Cloroză înseamnă schimbarea culorii de la verde la galben a organismului de testare, în special a vârtejurilor.

ECx înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvate în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu, 50 %) a creșterii *Myriophyllum spicatum* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau randament, se folosesc simbolurile „E_rC” pentru viteza de creștere, respectiv „E_yC” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E_rC (lungimea lăstarului principal).

Creștere înseamnă o mărire a variabilei de măsurare, cum ar fi lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri, în perioada de testare.

Viteză de creștere (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a biomasei în timpul perioadei de expunere. *Notă*: Variabile de răspuns legate de viteza de creștere sunt independente de durata testului atât timp cât tendința de creștere a organismelor de control neexpuse este exponențială.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) înseamnă cea mai scăzută concentrație testată la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Toate concentrațiile testate mai mari decât LOEC trebuie să aibă totuși un efect nociv egal sau mai mare decât cel observat la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, NOEC).

Variabile de măsurare înseamnă orice tip de variabilă care se măsoară pentru a exprima punctul final de testare prin folosirea uneia sau mai multor variabile de răspuns diferite. În cadrul acestei metode, lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor lateral, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor sunt variabile de măsurare.

Monocultură este o cultură cu o singură specie de plante.

Necroză înseamnă țesut mort (și anume, alb sau maro închis) al organismului de testare.

Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC) înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

Variabilă de răspuns înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. Pentru această metodă de testare, viteza de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum lungimea lăstarului principal, lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.

Test (de reînnoire) semistatic înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durata testului.

▼M7

Test static înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durata testului.

Substanță chimică de testare înseamnă orice substanță sau amestec care se testează utilizându-se această metodă de testare.

Punctul final de testare descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În această metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

Mediu de testare înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care plantele testate cresc atunci când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

UVCB este o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, un produs de reacție complex sau un material biologic.

Randament înseamnă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere. Notă: În cazul în care tendința de creștere a organismelor de testare neexpuse este exponențială, variabilele de răspuns bazate pe randament vor descrește cu durata testului.

▼M7

Apendicele 2

MEDIU ANDREWS MODIFICAT PENTRU CULTURA ȘI PRECULTURA STOC

Din cinci soluții stoc de nutrienți preparate separat modificate, va fi pregătit mediul Andrews modificat necesar pentru cultura și precultura stoc, cu un adaos de 3 % zaharoză.

Tabelul 1

Compoziția soluției nutritive Andrews: (Desemnare ASTM E 1913-04)

Producția de soluții stoc nutritive			Producția de soluție nutritivă
Soluție stoc	Substanță chimică	Greutate inițială per 1000 ml	ml per 5 l soluție nutritivă
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	A se vedea mai jos soluție stoc 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Soluțiile stoc pot fi păstrate în frigider timp de 6 luni (la o temperatură de 5-10 °C). Numai soluția stoc 5 are o valabilitate redusă (două luni).

Tabelul 2

Producția de soluție stoc 3.1 pentru prepararea soluției stoc 3

Substanța chimică	Greutatea inițială g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

După prepararea soluției stoc 3.1 (tabelul 2), soluția se congelează în aproximativ 11 mlalicote (la cel puțin – 18°C). Porțiile congelate au o perioadă de valabilitate de cinci ani.

Pentru a produce o soluție stoc 3, se decongelează soluția stoc 3.1, se pun 10 ml din aceasta într-un flacon volumetric și se adaugă apă ultrapură până la semnul de pe flacon.

Pentru a obține un mediu modificat Andrews, se umple un flacon volumetric de 5 ml cu aproximativ 2 500 ml. După adăugarea a 50 ml din fiecare soluție stoc, se umple 90 % din flaconul gradat cu apă ultrapură și se setează pH-ul la 5.8.

▼M7

Se adaugă apoi 150 g zaharoză dizolvată (3 % per 5 l); ulterior, se umple flaconul volumetric cu apă ultrapură până la semn. În cele din urmă, soluția nutritivă se toarnă în flacoane Schott de 1 l și se bagă la autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute.

Soluția nutritivă astfel produsă poate fi păstrată sterilă la frigider (la 5-10 °C) timp de trei luni.

Mediu Andrews modificat pentru testul de toxicitate fără sediment

Din cele cinci soluții stoc nutritive deja menționate în tabelele 1 și 2, se prepară un mediu Andrews modificat, concentrat de zece ori în vederea obținerii soluțiilor de testare, cu adaos de 30 % zaharoză. În acest scop, se toarnă aproximativ 100 ml de apă ultrapură într-un flacon volumetric de 1 l. După adăugarea a 100 ml din fiecare soluție stoc, se setează pH-ul la 5,8. Se adaugă apoi 30 % zaharoză dizolvată (300 gr per 1 000 ml); ulterior, se umple flaconul volumetric cu apă ultrapură până la semn.

În cele din urmă, soluția nutritivă se pune în flacoane Schott de 0,5 l și se bagă la autoclavă la 121 °C timp de 20 de minute.

Soluția nutritivă modificată și concentrată de zece ori astfel produsă poate fi păstrată în condiții sterile la frigider (la 5-10 °C) timp de trei luni.

▼M7

Apendicele 3

MENȚINEREA CULTURII STOC

În prezentul apendice 3 este descrisă cultura stoc de *Myriophyllum spicatum* L ([1]), o plantă acvatică dicotiledonată submersă din familia peniței. Între lunile iunie și august, flori discrete roz-albe își fac apariția la suprafața apei. Plantele sunt înrădăcinate în sol prin intermediul unui sistem robust de rizomi și pot fi găsite în întreaga emisferă nordică, în apele stătătoare eutrofice dar totuși nepoluate și mai bogate în calciu cu substrat noroios. *Myriophyllum spicatum* preferă apa dulce, dar se găsește și în apă salmastră.

Pentru a obține o cultură stoc fără sediment în condiții de laborator, sunt necesare plante sterile. Plantele sterile pot fi procurate de la laboratorul german Umweltbundesamt (Agenția Federală de Mediu din Germania).

În mod alternativ, organismele de testare pot fi preparate pornind de la plante nesterile în conformitate cu denumirea ASTM E 1913-04. A se vedea mai jos – extras din Ghidul Standard ASTM – procedura de cultivare a *Myriophyllum sibiricum* colectată de pe teren:

„Dacă se începe cu plante colectate de pe teren, nesterile, rădăcinile tuberoase de *M.sibiricum* se colectează toamna. Se așază rădăcinile tuberoase într-un acvariu de 20 l conținând 5 cm de sediment steril acoperit cu nisip pe bază de siliciu sau de exemplu de Turface® și 18 l de apă reactivă. Se aerează acvariul și se menține la o temperatură de 15 °C și o densitate între 200 și 300 μmol m^{-2} s^{-1} pentru 16 ore pe zi. Cultura plantelor în acvariu poate fi menținută ca o sursă de rezervă de plante în cazul în care culturile de plante sterile sunt distruse din cauza unei defecțiuni mecanice în dulapul de creștere, a contaminării sau din alte motive. Plantele cultivate în acvariu nu sunt sterile, iar culturile sterile nu pot fi menținute într-un sistem cu loturi de cultură. Pentru a steriliza cultura, plantele de acvariu sunt eliminate din acvarii și clătite sub flux de apă deionizată timp de aproximativ 0,5 ore. În condiții aseptice într-un dulap cu flux de aer laminar, plantele sunt dezinfectate mai puțin de 20 de minute (până ce partea cea mai mare a țesutului vegetal este albită și doar vârful aflat în creștere rămâne verde) într-o soluție de hipoclorit de sodiu 3 % (g/v) care conține 0,01 % dintr-un agent tensioactiv de suprafață adecvat. Se agită dezinfectantul și materialul vegetal. Segmentele cu mai multe noduri sunt transferate în tuburi sterile de cultură care conțin 45 ml de mediu Andrews modificat și sterilizat și acoperite cu închideri plane pentru tuburi de cultură. În fiecare cameră de testare se pune un singur segment vegetal. Pentru a asigura închiderea vasului de cultură, se folosește film de laborator de etanșare. Odată ce s-a stabilit o cultură sterilă, segmentele de plante care conțin mai multe noduri trebui transferate în camere noi de testare care conține un mediu nutritiv lichid proaspăt la fiecare zece până la douăsprezece zile. Astfel cum s-a demonstrat prin cultura pe plăci cu geloză, plantele trebuie să fie sterile și să rămână sterile timp de opt săptămâni înainte de începerea testului.”

Întrucât mediul Andrews modificat conține zaharoză (mediu care stimulează creșterea ciupercilor și a bacteriilor), toate materialele, soluțiile și culturile se efectuează în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer cald (210 °C) timp de 4 ore sau la autoclavă timp de 20 minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse tratamentului la flacără pe un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

Culturile stoc pot fi menținute în condiții de temperatură și iluminare reduse (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) pentru perioade mai îndelungate fără a fi nevoie să fie restabilite. Mediul de creștere pentru *Myriophyllum* trebuie să fie același cu

([1]) Carl von Linné (* May, 23th, 1707 in Råshult /Älmhult; † January, 10th, 1778 in Uppsala).

▼M7

mediul folosit pentru testare, dar pentru culturile stoc se poate folosi orice alt mediu bogat în nutrienți.

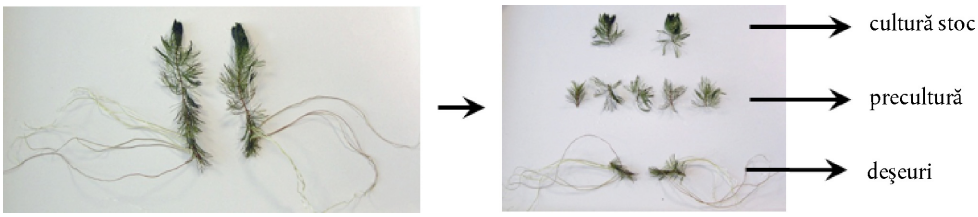
Segmentele vegetale sunt distribuite în mod axenic în mai multe flacoane Erlenmeyer de 500 ml și/sau Fernbach de 2 000 ml, fiecare umplut cu aproximativ 450 respectiv 1 000 ml de mediu Andrews modificat. Ulterior, flacoanele sunt acoperite în condiții axenice cu dopuri de celuloză.

În plus, este absolut necesar un tratament amănunțit cu flacără al echipamentului la un banc de lucru steril înainte de utilizare. În funcție de număr și de dimensiune, plantele urmează să fie transferate în soluție nutritivă proaspătă la intervale de aproximativ trei săptămâni.

Pentru această cultură reînnoită se pot folosi vârfurile, precum și segmente din partea centrală a tulpinii. Numărul și dimensiunea plantelor transferate (sau segmente de plante) depind de cât de multe plante sunt necesare. De exemplu, se pot transfera cinci segmente de lăstar într-un flacon Fernbach și trei segmente de lăstar într-un flacon Erlenmayer, fiecare cu o lungime de 5 cm. Se înlătură orice parte cu rădăcini, cu floare, moartă sau care se remarcă în alt fel.

Figura 1

Tăierea plantelor pentru cultura stoc și precultură după 3 săptămâni de la cultivare.



Cultura plantelor trebuie să fie realizată în flacoane Erlenmayer de 500 ml și Fernbach de 2 000 ml într-un incubator de răcire la 20 ± 2 °C cu o lumină continuă la aproximativ 100150 µE m^{-2} s^{-1} sau 6 000-9 000 lucși (emisă de iluminarea camerei cu temperatură de culoare „lumină albă caldă”).

Figura 2

Cultura plantelor într-un incubator de răcire cu iluminare.



Se folosesc vase de cultură din sticlă curate din punct de vedere chimic (curățate cu acid) și sterile, precum și tehnici de manipulare aseptică. În eventualitatea contaminării culturii stoc, de exemplu cu alge, ciuperci și/sau bacterii, se va prepara o cultură nouă sau se va reînnoi cultura cu o cultură stoc de la un alt laborator.

▼M7

Apendicele 4

ÎNTREȚINEREA PRECULTURII ȘI PREGĂTIREA ORGANISMULUI DE TESTARE PENTRU TESTARE

Pentru a obține o precultură, se taie lăstarii din cultura stoc în segmente cu câte două vârtejuri fiecare; se pun segmentele în flacoane Fernbach umplute cu mediu Andrews modificat (cu 3 % zaharoză). Fiecare flacon poate conține până la 50 de segmente de lăstar. Cu toate acestea, trebuie avut grijă ca segmentele să fie vitale și să nu aibă rădăcini și ramuri laterale sau muguri (a se vedea figura 1 din apendicele 3).

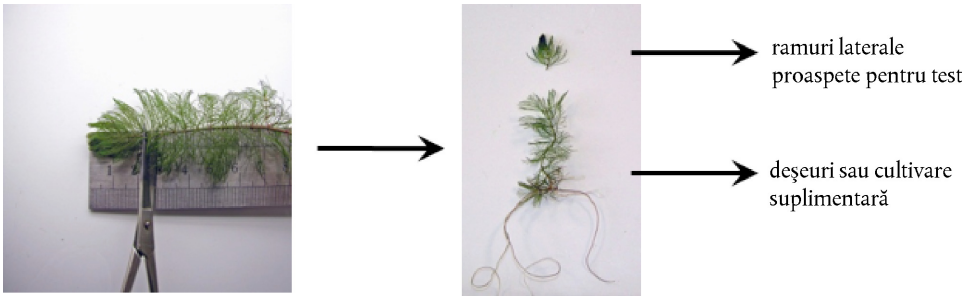
Organismele de precultură sunt cultivate timp de 14-21 de zile în condiții sterile într-o cameră cu condiții ambientale care alternează fazele de lumină/întuneric de 16/8 ore. Intensitatea luminii este selectată din intervalul de 100-150 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$. Temperatura din vasele de testare trebuie să fie de 23 ± 2 °C.

Întrucât mediul modificat Andrews conține zaharoză (mediu care stimulează creșterea de alge, ciuperci și bacterii), prepararea substanțelor de testare și cultura trebuie efectuate în condiții sterile. Toate lichidele, precum și echipamentele sunt sterilizate înainte de utilizare. Sterilizarea se realizează prin tratarea cu aer încălzit (210 °C) timp de 4 ore sau la autoclavă timp de 20 de minute la 121 °C. În plus, toate flacoanele, vasele, bolurile etc. și alte echipamente sunt supuse tratamentului la flacără la un banc de lucru steril chiar înainte de utilizare.

Lăstarii sunt înlăturați pe cale axenică din flacoanele de precultură, alegând un material cât se poate de omogen. Fiecare testare necesită cel puțin 60 de organisme de testare (testare cu opt concentrații chimice de testare). Pentru testare, se iau ramuri laterale proaspete din preculturi, se scurtează la 2,5 cm de la bază (măsurate cu rigla) și se transferă într-un pahar de laborator care conține un mediu Andrews modificat steril. Aceste ramuri laterale proaspete pot fi folosite pentru testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment.

Figura 2

Tăierea plantelor din precultură pentru testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment.



▼M7

C.51. TEST DE TOXICITATE PE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ÎNTR-UN SISTEM APĂ-SEDIMENT

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 239 (2014). Metodele de testare sunt valabile pentru planta acvatică monocotiledonată plutitoare, specia *Lemna* (1) și pentru speciile de alge. Aceste metode sunt utilizate în mod obișnuit pentru a genera date care să permită evaluarea riscului substanțelor chimice de testare, în special celor cu activitate de erbicid, pentru speciile de plante acvatice nevizate. Cu toate acestea, în unele cazuri pot fi necesare date pentru specii macrofite suplimentare. Conform unui ghid recent publicat în urma unui atelier organizat de Societatea de Toxicologie și Chimie a Mediului (SETAC) pe tema Evaluării riscului pesticidelor asupra macrofitelor acvatice (AMRAP), datele privind speciile de macrofite rădăcinoase se pot dovedi necesare pentru substanțele chimice de testare atunci când se cunoaște faptul că *Lemna* și algele nu sunt sensibile la modul de acțiune sau în cazul în care partiția în sediment reprezintă o problemă, conducând la expunere prin absorbție radiculară (3). Pe baza cunoștințelor și a experienței actuale, plantele de *Myriophyllum* au fost selectate ca specie preferată în cazurile în care sunt necesare date privind o specie dicotiledonată rădăcinoasă submersă (4) (5) (6). Acest test nu înlocuiește alte teste de toxicitate acută; mai degrabă acesta ar trebui să le completeze astfel încât să fie posibilă o evaluare completă a riscului și pericolului pentru plantele acvatice. Metoda de testare pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem apă-sediment completează testul de toxicitate pe *Myriophyllum spicatum* într-un sistem fără sediment (7).

2. Prezentul document descrie o metodă de testare care permite evaluarea efectelor unei substanțe chimice asupra speciei de plante acvatice rădăcinoase *Myriophyllum spicatum*, care crește într-un sistem apă-sediment. Metoda de testare se bazează parțial pe metodele existente (1) (2) (8) și ia în considerare cercetările recente legate de evaluarea riscului pentru plantele acvatice (3). Metoda apă-sediment a fost validată de un test circular internațional efectuat cu specii de *Myriophyllum* crescute în condiții statice, care au fost expuse la substanța chimică de testare prin aplicări realizate prin coloana de apă (9). Cu toate acestea, sistemul de testare este ușor adaptat pentru a permite expunerea prin intermediul unui sediment îmbogățit sau expunerea prin intermediul fazei apoase în regim semistatic sau scenarii doză-impulsuri, deși aceste scenarii nu au fost supuse oficial testului circular. Suplimentar, metoda generală poate fi folosită pentru alte specii rădăcinoase submerse și înălțătoare, inclusiv alte specii de *Myriophyllum* (de exemplu, *Myriophyllum aquaticum)* și *Glyceria maxima* (10). Modificări ale condițiilor, conceptului și duratei testului pot fi necesare pentru specii alternative. În special, sunt necesare eforturi suplimentare pentru a defini proceduri adecvate pentru *Myriophyllum aquaticum*. Aceste opțiuni nu sunt prezentate în detaliu în cadrul prezentei metode de testare, care descrie abordarea standard pentru expunerea *Myriophyllum spicatum* într-un sistem static prin faza apoasă.

3. Această metodă de testare se aplică substanțelor pentru care metoda de testare a fost validată [a se vedea detalii în raportul testului circular (9)] sau formule sau amestecuri cunoscute. Un test pe *Myriophyllum* poate fi efectuat pentru a îndeplini o cerință de date de nivel 1 declanșată de o potențială partiționare a substanței chimice în sediment sau de aspecte privind modul de acțiune/selectivitate. De asemenea, un test de laborator pe *Myriophyllum* poate fi necesar ca parte a unei strategii de nivel superior de a aborda preocupări legate de riscul pentru plantele acvatice. Motivul specific pentru efectuarea unui test va determina calea de expunere (și anume, prin apă sau sediment). Înainte de utilizarea acestei metode pentru testarea unui amestec destinat unui scop de reglementare, trebuie să se examineze dacă și, în caz afirmativ, motivele pentru care aceasta poate oferi rezultate adecvate în acest scop. Astfel de considerații nu sunt necesare atunci când există o cerință normativă pentru testarea amestecului.

▼M7

PRINCIPIUL TESTULUI

4. Scopul testului este de a evalua efectele substanțelor chimice asupra creșterii vegetative a plantelor de *Myriophyllum* care cresc în medii standardizate (apă, sediment și nutrienți). În acest scop, muguri de lăstari proveniți de la plante sănătoase, fără inflorescență se plantează în ghivece în sediment standardizat, artificial, căruia i se adaugă nutrienți pentru a asigura creșterea adecvată a plantei, iar apoi sunt menținuți în mediu Smart și Beko (apendicele 1). După o perioadă de stabilire necesară pentru a permite formarea rădăcinilor, plantele sunt expuse unei serii de concentrații de testare adăugate în coloana de apă. Ca alternativă, expunerea prin sediment poate fi simulată prin îmbogățirea sedimentului artificial cu substanța chimică de testare și transplantarea plantelor în acest sediment îmbogățit. În ambele cazuri, plantele sunt menținute ulterior în condiții de mediu controlat timp de 14 zile. Efectele asupra creșterii se determină pe baza evaluărilor cantitative privind lungimea lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată, precum și pe baza observațiilor calitative ale unor simptome precum necroza, cloroza sau deformări de creștere.

5. Pentru a cuantifica efectele substanței chimice, creșterea în soluțiile de testare este comparată cu creșterea plantelor de control, iar concentrația care producere o inhibare de x % a creșterii este determinată și exprimată ca EC_x; „x” poate fi orice valoare care depinde de cerințele de reglementare, de exemplu EC_{10} EC_{20} și EC_{50}. Trebuie remarcat că estimările valorilor EC_{10} și EC_{20} sunt fiabile și adecvate doar în cadrul testelor în care coeficienții de variație ai plantelor de control scad sub nivelul estimat al efectului, și anume coeficienții de variație trebuie să fie <20 % pentru estimarea precisă a unei EC_{20}.

6. Se vor determina atât viteza medie specifică de creștere (estimată în urma evaluărilor lungimii lăstarilor, a greutății în stare proaspătă și a greutății uscate) cât și randamentul (estimată pe baza creșterii lungimii lăstarilor, a greutății în stare proaspătă și a greutății uscate) la plantele tratate și netratate. Viteza specifică de creștere (r) și randamentul (y) sunt folosite prin urmare ca să determine E_rC_x (de exemplu, E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) și, respectiv, E_yC_x (de exemplu, E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. În cazul în care este necesar, concentrația cea mai scăzută pentru care se observă un efect (LOEC) și concentrația la care nu se observă niciun efect (NOEC) se pot determina statistic pe baza estimărilor ratelor medii specifice de creștere și ale randamentului.

INFORMAȚII PRIVIND SUBSTANȚA CHIMICĂ DE TESTARE

8. Este necesar să se cunoască o metodă analitică cu sensibilitate specifică pentru cuantificarea substanței chimice în mediul de testare.

9. Informațiile despre substanța chimică de testare care se pot dovedi utile în stabilirea condițiilor de testare includ formula structurală, compoziția în cazul substanțelor multi-constituent, UVCB, amestecuri sau formule, puritatea, solubilitatea în apă, stabilitatea în apă și la lumină, constanta de disociere (pK_a), coeficientul de partiție octanol-apă (K_{ow}), dacă este disponibil coeficientul de partiție la sediment (K_d), presiunea vaporilor și biodegrabilitatea. Solubilitatea în apă și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă sunt posibile pierderi semnificative ale substanței chimice de testare în timpul perioadei de testare. În cazul în care sunt susceptibile pierderi ale substanțelor chimice de testare, acestea trebuie cuantificate, iar etapele ulterioare pentru a controla pierderile trebuie documentate. Dacă informațiile privind solubilitatea și stabilitatea substanței/substanțelor de testare sunt incerte, se recomandă ca aceste caracteristici să fie evaluate în condițiile de testare, și anume mediul de creștere, temperatura, regimul de iluminare care urmează a fi folosite pentru test. *Notă*: Atunci când se testează ierbicide cu efect de peroxidare dependente de lumină, iluminarea din laborator trebuie să conțină prezența echivalentă a luminii solare ultraviolete care se găsește în lumina solară naturală.

▼M7

10. pH-ul se măsoară și se ajustează în mediul de testare, după caz. Controlul pH-ului mediului de testare este deosebit de important, de exemplu în cursul testării unor metale sau substanțe instabile din punct de vedere hidrolitic. Alte orientări privind testarea substanțelor cu proprietăți fizico-chimice care le fac dificil de testat sunt prezentate într-un document de orientare al OCDE (11).

VALIDITATEA TESTULUI

11. Pentru ca rezultatele testului să fie valabile, lungimea totală medie a lăstarilor și greutatea totală medie în stare proaspătă a lăstarilor la plantele de control trebuie să fie cel puțin duble în timpul fazei de expunere a testului. În plus, plantele de control nu trebuie să prezinte simptome evidente cu ochiul liber de cloroză și trebuie să fie vizibil necontaminate cu alte organisme, cum ar fi alge și/sau filme bacteriene pe plante, la suprafața sedimentului și în mediul de testare.

12. Coeficientul mediu de variație pentru randament bazat pe măsurători ale greutății lăstarilor în stare proaspătă (și anume, de la începutul până la sfârșitul testului) în culturile de control nu trebuie să depășească 35 % între probele duplicat.

SUBSTANȚA CHIMICĂ DE REFERINȚĂ

13. O substanță chimică de referință, cum ar fi 3,5-diclorofenol folosit la testul circular (9), se va testa periodic pentru a verifica performanța procedurii de testare de-a lungul timpului. Testul circular indică faptul că media valorilor EC_{50} la 3,5-DCP pentru variabile de măsurare diferite s-a situat între 4,7 și 6,1 mg/l (a se vedea raportul testului circular pentru detalii privind intervalul de încredere anticipat în jurul acestor valori). Este recomandabil să se testeze o substanță chimică cel puțin de două ori pe an sau, dacă testarea se desfășoară rar, în paralel cu testele de toxicitate definitive. Un ghid pentru valorile preconizate ale EC_{50} la 3,5-dcp este oferit în Raportul statistic privind testul circular internațional (9).

DESCRIEREA METODEI

Aparatura de testare

14. Testul trebuie să fie efectuat în condiții de mediu controlate, și anume într-o încăpere sau o cameră de creștere sau un laborator, cu durata, lumina și temperatura controlabile (a se vedea secțiunea „Condiții de testare”, punctele 56-58). Culturile stoc se mențin separat de vasele de testare.

15. Studiul se efectuează folosind vase de testare din sticlă cum ar fi acvarii sau pahare de laborator; în general se folosesc pahare de sticlă cu o capacitate de 2 l (cu o înălțime de aproximativ 24 cm și cu un diametru de 11 cm). Cu toate acestea, și alte vase (mai mari) se pot dovedi adecvate cu condiția să existe o adâncime suficientă a apei pentru a permite creșterea nelimitată și pentru a menține plantele submersate pe toată durata testului.

16. Ghivece din sticlă sau plastic (cu un diametru de aproximativ 9 cm, o înălțime de 8 cm și un volum de 500 ml) pot fi folosite ca recipiente pentru înglobarea plantelor în sediment. Alternativ, pot fi folosite pahare din sticlă, care sunt preferate în unele cazuri (de exemplu, testarea chimicalelor hidrofobice sau a substanțelor cu un K_{ow} ridicat).

17. Alegerea dimensiunii ghiveciului/paharului trebuie avută în vedere împreună cu alegerea vaselor de testare și a conceptului de testare preferat (a se vedea mai jos). În cazul în care se folosește conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci cu trei ghivece per vas), este posibil să fie necesare ghivece sau vase mai mici. În cazul utilizării conceptului de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), ghiveciul precizat și dimensiunile vasului ar trebui să corespundă. În toate cazurile, adâncimea minimă a apei acoperitoare trebuie stabilită la 12 cm peste nivelul superior al sedimentului, iar raportul dintre suprafața/volumul sedimentului și suprafața/volumul de apă trebuie să fie înregistrat.

▼M7

Organismul de testare

18. Abordările generale descrise în această metodă de testare pot fi utilizate pentru a testa o serie de specii de plante acvatice. Cu toate acestea, condițiile prezentate în această metodă de testare au fost modificate pentru testarea pe *Myriophyllum spicatum,* din specia penița apei. Această specie aparține familiei de dicotiledonate, *Haloragaceae*.

19. *Myriophyllum spicatum* (penița apei eurasiatică) este o specie rădăcinoasă submersă care tolerează un interval larg de condiții și se găsește atât în apele stătătoare, cât și cele curgătoare. *M. spicatum* este o plantă perenă care pe timpul iernii moare până la rădăcină. De obicei, florile înfloresc și împrăștie semințe nestingherit, deși propagarea vegetativă din mugurii auxiliari sau fragmente de tulpină care se detașează natural sau în urma unei perturbări constituie adesea metoda principală de colonizare.

Cultivarea organismului de testare

20. Plantele pot fi obținute din populații naturale sau prin intermediul furnizorilor de plante acvatice. În ambele cazuri, sursa plantelor trebuie să fie documentată, iar identitatea speciilor trebuie să fie verificată. Trebuie să se acorde o atenție deosebită pentru a se asigura că se obține specia corectă atunci când se colectează *Myriophyllum spicatum* de pe teren, în special în regiuni unde aceasta se poate hibridiza cu alte specii de *Myriophyllum*. În cazul în care există dubii, se recomandă utilizarea unor culturi verificate de laborator din surse cunoscute. Plantele care au fost expuse la orice fel de contaminanți chimici sau colectate din situri despre care s-a stabilit că sunt contaminate nu trebuie să fie utilizate în acest test.

21. În regiunile unde *M. spicatum* se găsește greu în timpul lunilor de iarnă, se poate dovedi necesară întreținerea pe termen lung a culturilor stoc în condiții de seră sau de laborator. Culturile stoc trebuie menținute în condiții similare cu condițiile de testare, deși iradiația și temperatura pot fi reduse în vederea scăderii frecvenței de menținere a culturii (de exemplu, atunci când nu se planifică teste pe *Myriophyllum* pentru o perioadă). Utilizarea unor acvarii și ghivece mai mari, folosite ulterior la teste, este recomandată pentru a oferi spațiu pentru proliferare. Compoziția sedimentului și a mediului apos trebuie să fie aceeași cu cea folosită pentru teste, deși pot fi adoptate metode alternative de fertilizare a sedimentului (de exemplu, utilizarea formulelor comerciale de fertilizator cu eliberare prelungită).

22. Plantele stoc trebuie să fie lipsite în mod clar de orice contaminare cu alte organisme, inclusiv melci, alge filamentoase, ciuperci și insecte, de exemplu ouă sau larve de molie *Paraponyx stratiotata* sau larve și adulți de curculionide *Eubrychius velutus*. Clătirea materialului vegetal cu apă proaspătă se poate dovedi necesară pentru a elimina orice contaminare vizibilă. De asemenea, trebuie depuse eforturi pentru a minimiza dezvoltarea algelor unicelulare și contaminarea cu bacterii, însă sterilitatea completă a materialului vegetal nu este necesară. Culturile stoc trebui să fie monitorizate și transplantate în funcție de necesități, astfel încât să se evite dezvoltarea algelor și contaminarea bacteriană. Aerarea culturilor stoc se poate dovedi benefică în cazul în care contaminarea cu alge sau bacterii devine problematică.

23. În toate cazurile, plantele sunt cultivate/aclimatizate în condiții similare, dar nu neapărat identice cu cele utilizate în cadrul testului pentru o perioadă adecvată (și anume > 2 săptămâni) înainte de utilizarea lor în cadrul unui test.

24. Culturile stoc cu inflorescență nu trebuie să fie folosite într-un test deoarece vitezele de creștere vegetativă în general scad în timpul înfloririi și ulterior.

▼M7

Sediment

25. Următorul sediment preparat, care are la bază sedimentul artificial descris în capitolul C. 28 din prezenta anexă (8), este recomandat pentru utilizare în cadrul acestui test. Sedimentul este preparat conform descrierii din TM C.28, cu excepția adaosului de nutrienți conform descrierii de mai jos:

a) 4-5 % turbă (greutate uscată, în conformitate cu 2 ± 0,5 % carbon organic), cât mai aproape posibil de un pH între 5,5 și 6; este important să se folosească turbă pulbere măcinată fin (preferabil cu o dimensiune a particulei < 1 mm) și uscată doar la aer.

b) 20 % (greutate uscată) caolin (de preferință, cu conținut de caolinit de peste 30 %);

c) 75-76 % (greutate uscată) nisip cuarțos (trebuie să predomine nisipul fin, cu peste 50 % particule între 50 și 200 μm).

d) Se adaugă un mediu nutritiv apos astfel încât lotul final de sediment să conțină 200 mg/kg sediment uscat de clorură de amoniu și fosfat de sodiu, iar conținutul de umiditate din amestecul final să fie situat într-un interval de 30-50 %.

e) Carbonatul de calciu cu o calitate pură din punct de vedere chimic ($CaCO_3$) se adaugă pentru a ajusta pH-ul amestecului final al sedimentului la 7,0 ± 0,5.

26. Sursa de turbă, argilă caolin și nisip trebuie să fie cunoscută și documentată. În cazul în care originea este necunoscută sau generează un anumit nivel de preocupare, componentele respective trebuie să fie verificate, pentru a dovedi absența contaminării chimice (de exemplu, metale grele, compuși organici clorurați, compuși organici fosforici).

27. Constituenții uscați ai sedimentului trebuie să fie amestecați în mod omogen înainte de a amesteca complet soluția nutritivă apoasă în sediment. Sedimentul umed trebuie preparat cu cel puțin două zile înainte de utilizare pentru a permite înmuierea turbei și pentru a împiedica particulele de turbă hidrofobă să plutească la suprafață atunci când peste sediment se așază mediul; înainte de utilizare, sedimentul umed poate fi păstrat la întuneric.

28. Pentru test, sedimentul se transferă în containere de mărime corespunzătoare, cum ar fi ghivece cu un diametru care se încadrează în vasele de sticlă (suprafața sedimentului trebuie să acopere aproximativ 70 % sau mai mult din suprafața vasului). În cazul în care containerul are orificii în partea de jos, o bucată de hârtie de filtru în partea inferioară a rezervorului va contribui la păstrarea sedimentului în recipient. Ghivecele sunt umplute cu sediment, astfel încât suprafața sedimentului să fie egală, înainte de acoperirea cu un strat subțire (~ 2 până la 3 mm) de material inert, cum ar fi nisip, pietriș fin măcinat (sau coral zdrobit) pentru a fixa sedimentul.

Mediul de testare

29. Pentru cultura și testarea *Myriophyllum spicatum*, se recomandă folosirea unui mediu Smart și Barko (12). Pregătirea acestui mediu este descrisă în apendicele 1. pH-ul mediului (faza apoasă) la începutul testului trebuie să fie cuprins între 7,5 și 8,0 pentru o creștere optimă a plantelor.

Conceptul experimental

30. Testul trebuie să includă cel puțin șase vase de testare duplicat pentru proba de control nesupusă tratamentului și minim patru vase de testare duplicat pentru fiecare dintre cele cel puțin cinci niveluri de concentrație.

31. Dacă determinarea NOEC nu este necesară, conceptul de testare poate fi modificată în sensul creșterii numărului de concentrații și al reducerii numărului de probe duplicat per concentrație

▼M7

32. Fiecare vas de testare reprezintă o probă duplicat conținând trei lăstari. Există două opțiuni pentru cultivarea a trei lăstari în fiecare vas de testare:

— conceptul de testare A: un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas.

— conceptul de testare B: trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas.

— Conceptele alternative de testare cu un lăstar per vas de testare sunt acceptabile cu condiția ca duplicarea să corespundă criteriilor de validitate cerute.

33. Vasele de testare individuale trebuie să fie repartizate aleatoriu în grupurile de tratament. Vasele de testare se poziționează aleatoriu în zona de testare pentru a minimiza influența diferențelor spațiale în intensitatea luminii sau în temperatură.

Concentrațiile substanței chimice de testare și grupurile de control

34. În mod obișnuit, concentrațiile trebuie să urmeze o serie geometrică; factorul de separare între concentrațiile de testare nu trebuie să depășească 3,2. Cunoașterea în prealabil a toxicității substanței chimice de testare printr-un un test de stabilire a intervalului va contribui la selectarea concentrațiilor potrivite de testare.

35. Pentru determinarea unei ECx, concentrațiile de testare trebuie să încadreze valoarea ECx în scopul asigurării unui nivel de încredere adecvat. De exemplu, dacă se estimează EC_{50}, cea mai mare concentrație de testare trebuie să fie mai mare decât valoarea EC_{50}. Dacă valoarea EC_{50} se află în afara intervalului concentrațiilor de testare, intervalele de încredere aferente vor fi mari și există riscul ca evaluarea corectă a adecvării statistice a modelului să nu fie posibilă. Utilizarea mai multor concentrații de testare va îmbunătăți intervalul de încredere în jurul valorii rezultate a ECx.

36. Dacă se urmărește estimarea LOEC/NOEC (punct final opțional), concentrația cea mai scăzută de testare trebuie să fie suficient de scăzută încât creșterea să nu fie semnificativ mai mică decât cea a plantelor de control. În plus, concentrația cea mai mare de testare trebuie să fie suficient de mare încât creșterea să fie semnificativ mai mică decât cea a probei de control. Utilizarea mai multor probe duplicat va consolida puterea statistică a conceptului concentrației fără efect/ANOVA.

Test la valori-limită

37. În cazul în care un test de stabilire a intervalului arată că substanța chimică de testare nu are efecte adverse în concentrații de până la 100 mg/l sau până la limita sa de solubilitate în mediul de testare sau, în cazul unei formule până la limita de dispersabilitate, se poate efectua un test la valori-limită pentru a facilita compararea răspunsurilor unui grup de control și ale unui grup supus tratamentului – 100 mg/l sau o concentrație egală cu limita solubilității sau 1000 mg/kg sediment uscat. Un astfel de test trebuie să respecte principiile generale ale unui test standard doză-răspuns, cu excepția faptului că se recomandă creșterea numărului minim de probe duplicat la șase vase de testare per control și concentrație. Creșterea la grupul de control și la cel supus tratamentului poate fi analizată folosind un test statistic pentru compararea mediilor, de exemplu un test-t Student.

Soluții de testare

38. Soluțiile de testare se prepară de regulă prin diluarea unei soluții stoc, prin dizolvarea substanței chimice de testare sau prin dispersarea substanței chimice de testare în mediul Smart și Barko, folosind apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată) (a se vedea apendicele 1).

▼M7

39. Concentrația cea mai mare de testare nu trebuie să depășească în mod normal solubilitatea în apă a substanței chimice de testare sau, în cazul formulelor, dispersabilitatea în condițiile de testare.

40. Pentru substanțele chimice de testare cu solubilitate scăzută în apă, poate fi necesară prepararea unei soluții stoc concentrate sau dispersia substanței chimice folosind un solvent organic sau un agent de dispersie, pentru a facilita adăugarea de cantități exacte de substanță de testare în mediul de testare și pentru a favoriza dispersia și dizolvarea acesteia. Trebuie depuse toate eforturile pentru a evita utilizarea acestui tip de solvenți sau agenți de dispersie. Nu se vor folosi solvenți sau agenți de dispersie suplimentari în urma cărora să rezulte fitotoxicitate. De exemplu, solvenții obișnuiți, care nu provoacă fitotoxicitate la concentrații de până la 100 µl/l, includ acetona și dimetilformamida. Dacă se folosește un solvent sau un agent de dispersie, concentrația sa finală se raportează și se menține la valoarea minimă (≤ 100 µl/l). În aceste circumstanțe, toate probele de tratament și de control (cu solvent) trebuie să conțină aceeași concentrație de solvent sau agent de dispersie. Probele de control duplicate netratate care nu conțin un solvent sau un agent de dispersie sunt incluse, de asemenea, în conceptul de testare. Orientări suplimentare privind folosirea agenților de dispersie sunt prevăzute într-un document de orientare al OCDE (11).

PROCEDURA DE TESTARE

41. Procedura de testare variază în funcție de modul de utilizare a substanței chimice de testare (și anume, prin faza apoasă sau faza de sediment). Comportamentul preconizat al substanței chimice de testare într-un sistem apă-sediment trebuie luat în considerare pentru a explica alegerea regimului de expunere utilizat în test (și anume, static sau reînnoire statică, apă îmbogățită – sediment îmbogățit). Testele cu sediment îmbogățit pot fi preferate în unele cazuri pentru substanțele chimice prevăzute să se distribuie în mod semnificativ în sediment.

Faza de stabilire

42. Vârfurile lăstarilor sănătoși, și anume fără lăstari laterali, sunt tăiate din plantele de cultură lăsând o lungime a lăstarilor de 6 cm (± 1 cm). Pentru conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas), se plantează vârfuri de lăstar în fiecare ghiveci. Pentru conceptul de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), se plantează patru-cinci vârfuri de lăstar în fiecare ghiveci care conține sediment.

43. În ambele cazuri, ghivecele în plus trebuie cultivate pentru a permite selectarea unor plante uniforme la inițierea testului, dar și pentru a oferi plante de rezervă care vor fi utilizate pentru a analiza creșterea rădăcinii imediat înainte de începerea tratamentului, precum și plante de rezervă care sunt destinate recoltării pentru măsurarea biomasei și a lungimii lăstarilor în ziua 0.

44. Lăstarii se introduc astfel încât aproximativ trei centimetri, care acoperă cel puțin două noduri, să se afle sub suprafața sedimentului.

45. Ghivecele sunt transferate apoi în vasele de testare în aceleași condiții de mediu ca pentru faza de expunere și sunt menținute timp de șapte zile în mediu Smart și Barko pentru a stimula dezvoltarea rădăcinii.

46. După această perioadă, mai multe plante în ghivecele de rezervă trebuie scoase pentru a observa creșterea rădăcinii. În cazul în care creșterea rădăcinii nu este vizibilă (și anume, vârfurile rădăcinii nu sunt vizibile), atunci faza de stabilire trebuie prelungită până ce creșterea rădăcinii devine vizibilă. Această etapă este recomandată pentru a se asigura că plantele sunt în fază de creștere activă în momentul începerii testului.

▼M7

Selectarea materialului vegetal uniform

47. Pentru conceptul de testare A (un lăstar per ghiveci și trei ghivece per vas), se aleg ghivece pentru uniformitate înainte de începerea testului. Pentru conceptul de testare B (trei lăstari per ghiveci și un ghiveci per vas), plantele excedente sunt îndepărtate astfel încât să rămână trei plante care sunt uniforme ca dimensiune și aspect.

Expunerea prin faza apoasă

48. Ghivecele, selectate astfel încât să fie uniforme, sunt introduse în vasele de testare conform conceptului experimental. Mediul Smart și Barko se adaugă apoi în vasele de testare. Trebuie acordată atenție pentru a evita deranjarea sedimentului. În acest scop, mediile se pot adăuga acoperind sedimentul cu o pâlnie sau un disc din plastic în timp ce se toarnă mediul în vasele de testare, cu condiția ca discul să fie înlăturat imediat. În mod alternativ, ghivecele pot fi puse în vasele de testare după adăugarea mediilor. În ambele cazuri, medii proaspete pot fi utilizate la începutul fazei de expunere, în cazul în care este necesar să se acționeze pentru a minimiza potențialul de acumulare de bacterii și alge sau pentru a permite pregătirea unei singure serii de soluție de testare pentru toate probele duplicate.

49. Lungimea lăstarilor deasupra sedimentului se măsoară, fie înainte sau după adăugarea mediului.

50. Cantități corespunzătoare din substanța chimică de testare pot fi adăugate la mediul de testare înainte de adăugarea acestuia în vasele de testare. Alternativ, substanța chimică de testare se poate introduce în mediu după ce acesta a fost adăugat în vasele de testare. În acest caz, trebuie acordată atenție pentru a se asigura că substanța chimică de testare este distribuită în mod omogen în întreg sistemul de testare fără a tulbura sedimentul.

51. În toate cazurile, aspectul (de exemplu, limpede, tulbure etc.) mediului de testare se înregistrează la începerea testului.

Expunerea prin sediment

52. Sedimentele îmbogățite pentru concentrația aleasă sunt preparate prin adăugarea unei soluții a substanței chimice de testare direct în sedimentul proaspăt. O soluție stoc de substanță chimică de testare dizolvată în apă deionizată este amestecată cu sedimentul formulat cu ajutorul unui tambur, al unui malaxor sau prin amestecare manuală. În cazul în care este puțin solubilă în apă, substanța chimică de testare se poate dizolva într-un volum cât se poate de mic de solvent organic adecvat (de exemplu, hexan, acetonă sau cloroform). Această soluție este amestecată apoi cu 10 g de nisip de cuarț fin pentru un vas de testare. Se așteaptă evaporarea solventului, iar apoi nisipul este amestecat cu o cantitate adecvată de sediment în fiecare pahar de laborator. Pentru solubilizarea, dispersia sau emulsionarea substanței chimice de testare se pot folosi numai agenți cu volatilizare rapidă. Este necesar să se țină cont de faptul că volumul/greutatea nisipului îmbogățit cu substanța chimică de testare trebuie luat(ă) în considerare pentru prepararea finală a sedimentului (și anume, sedimentul trebuie să fie astfel preparat cu mai puțin nisip). Trebuie avut grijă ca substanța chimică de testare adăugată la sediment să fie distribuită complet și uniform în sediment.

53. Ghivecele se umplu cu sediment îmbogățit (conform descrierii de mai sus). Plantele, selectate astfel încât să fie uniforme și să aibă sistemul radicular adecvat, sunt scoase din ghivecele utilizate în timpul fazei de stabilire și sunt mutate în sedimentul îmbogățit, conform descrierii de mai sus.

54. Ghivecele sunt introduse în vasele de testare conform conceptului experimental. Mediul Smart și Barko se adaugă apoi cu grijă (și anume, utilizând o pâlnie) pentru a se evita perturbarea sedimentului. Se măsoară lungimea lăstarilor deasupra sedimentului, fie înainte sau după adăugarea mediului.

▼M7

Menținerea nivelurilor apei pe durata testului

55. Volumul final de apă trebuie să fie înregistrat, iar nivelul apei este marcat pe fiecare vas de testare. În cazul în care apa se evaporă în timpul testului mai mult de 10 %, nivelul apei trebuie ajustat cu apă distilată. În cazul în care este necesar, paharele de laborator pot fi acoperite ușor cu un capac transparent, cum ar fi capace din plastic transparent pentru a se reduce la minim evaporarea și contaminarea cu spori de alge.

Condiții de testare

56. Se utilizează o lumină fluorescentă albă caldă și/sau rece pentru a oferi o iradianță luminoasă situată în intervalul de aproximativ 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ când se măsoară ca o radiație activă din punct de vedere fotosintetic (400-700 nm) la suprafața apei și folosind un raport lumină:întuneric de 16:8 ore. Orice diferență față de iradianța aleasă în zona de testare nu trebuie să depășească intervalul de ± 15 %.

57. Temperatura din vasele de testare este de 20 ± 2 °C.

58. Valoarea pH-ului mediului de control nu trebuie să crească cu mai mult de 1,5 unități în timpul testului. Cu toate acestea, o abatere de peste 1,5 unități nu va invalida testul dacă se poate demonstra că sunt îndeplinite criteriile de validitate specificate anterior.

Durata testului

59. Perioada de expunere este de 14 zile.

Măsurători și determinări analitice

60. După faza de stabilire și imediat înainte de tratament (și anume, în ziua 0), plantele de rezervă din cinci ghivece selectate aleatoriu pentru conceptul de testare care prevede trei plante per ghiveci sau din 15 ghivece pentru conceptul de testare care prevede o plantă per ghiveci, sunt recoltate pentru a evalua lungimea lăstarilor, greutatea în stare proaspătă și greutatea uscată, conform descrierii de mai jos.

61. Pentru plantele transferate în faza de expunere, următoarele evaluări se efectuează conform descrierii din tabelul 1:

— Evaluările lungimii lăstarului principal, ale numărului lăstarilor laterali și ale lungimii lăstarilor laterali se înregistrează cel puțin la sfârșitul perioadei de expunere (de exemplu,în ziua 14).

— Evaluarea vizuală a sănătății plantelor se înregistrează cel puțin de trei ori în timpul perioadei de expunere (de exemplu,în zilele 0,7 și 14).

— Evaluările greutății lăstarilor în stare proaspătă și ale greutății uscate sunt efectuate la sfârșitul testului (și anume, 14).

62. Lungimea lăstarilor se determină utilizând o riglă. În cazul în care sunt prezenți lăstari laterali, numărul și lungimea acestora trebuie, de asemenea, să fie măsurate.

63. Evaluările vizuale ale sănătății plantelor sunt efectuate prin înregistrarea aspectului plantelor și a stării generale a mediului de testare. Observațiile care trebuie notate includ:

— Necroză, cloroză sau alt tip de decolorare cum ar fi înroșirea excesivă în raport cu plantele de control.

— Dezvoltarea contaminării cu bacterii sau alge;

— Anomalii de creștere precum întârzieri în dezvoltare, lungime internodală alterată, lăstari deformați/frunze deformate, proliferarea lăstarilor laterali, pierderea de frunze, pierderea turgorii și fragmentarea tulpinei.

▼M7

— Evaluările vizuale ale sănătății rădăcinii se efectuează la sfârșitul testului, prin spălarea cu grijă a sedimentului de pe rădăcini pentru a face posibilă observarea sistemului radicular. O scară propusă de evaluare în comparație cu plantele de control este prevăzută mai jos:

1) rădăcini absente

2) rădăcini puține

3) dezvoltare moderată a rădăcinii

4) dezvoltare foarte bună a rădăcinii, similară plantelor de control

64. Evaluările greutății în stare proaspătă se realizează la începutul și la sfârșitul testării prin tăierea lăstarilor la nivelul sedimentului, urmată de o zvântare înainte de cântărire. Trebuie acordată atenție pentru a îndepărta particulele de sediment care pot adera la baza lăstarului. Materialul lăstarului este plasat ulterior într-un cuptor de uscare la aproximativ 60 °C și este uscat până la o greutate constantă, înainte de a de a-l cântări din nou și de a-i înregistra greutatea uscată.

65. Un rezumat al evaluărilor biologice minime necesare pe durata perioadei de testare este prevăzut în tabelul 1.

Tabelul 1

Programul de evaluare

Ziua ulterioară tratamentului (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Lungimea lăstarilor, lungimea și numărul lăstarilor laterali	Evaluarea vizuală a lăstarilor	Greutatea lăstarilor în stare proaspătă și greutatea uscată, Evaluarea vizuală a rădăcinilor	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: indică faptul că sunt necesare evaluări cu aceste ocazii
—: indică faptul că măsurătorile nu sunt necesare

Frecvența măsurătorilor și determinărilor analitice

66. Temperatura mediului într-un vas suplimentar menținut în condiții similare în încăperea, incubatorul sau camera de creștere se înregistrează cel puțin o dată pe zi (sau în mod continuu, cu un înregistrator de date).

67. Valoarea pH-ului și concentrația oxigenului dizolvat din mediul de testare trebuie să fie verificate la începutul testului, cel puțin o dată în timpul testului și la sfârșitul studiului, în toate vasele duplicat. Cu fiecare ocazie, măsurătorile trebuie efectuate în același moment al zilei. În cazul în care sunt folosite soluții în vrac la prepararea tuturor vaselor duplicat la fiecare concentrație de testare, o singură măsurătoare pentru fiecare soluție este acceptabilă pentru fiecare soluție vrac în ziua 0.

68. Iradianța se măsoară în încăperea, incubatorul sau camera de creștere în puncte echivalente cu nivelul suprafeței apei. Măsurătorile se efectuează cel puțin o dată la începutul testului sau în timpul testului. Metoda de detectare și măsurare a luminii, în special tipul de senzor, va influența valoarea măsurată. Senzorii sferici (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra și dedesubtul planului de măsurare) și senzorii

▼M7

„cosinus” (care răspund la lumină din toate unghiurile de deasupra planului de măsurare) sunt preferabili senzorilor unidirecționali și vor da valori mai mari pentru o sursă de lumină multipunct de tipul celei descrise aici.

Măsurători analitice ale substanței chimice de testare

69. Aplicarea corectă a substanței chimice de testare trebuie să fie susținută de măsurători analitice ale concentrațiilor acesteia.

70. Eșantioanele de apă trebuie să fie colectate pentru analiza substanței chimice testate la scurt timp după începerea testului (și anume, în ziua aplicării pentru substanțe chimice de testare stabile sau la o oră după aplicare pentru substanțe chimice care nu sunt stabile) și la încheierea testului pentru toate concentrațiile testate.

71. Concentrațiile în sediment și în apa interstițială din sediment trebuie stabilite la începutul și la sfârșitul testului, cel puțin pentru concentrația cea mai mare de testare, cu excepția cazului în care substanțele chimice de testare sunt cunoscute a fi stabile în apă (> 80 % din valoarea nominală). Măsurătorile în sediment și în apa interstițială se pot dovedi inutile în cazul în care partiționarea substanței chimice de testare între apă și sediment a fost clar determinată în cadrul unui studiu apă/sediment, în condiții comparabile (de exemplu, raportul sediment-apă, modul de aplicare, tipul de sediment).

72. Eșantionarea sedimentului la începutul testului ar putea să perturbe sistemul de testare. Prin urmare, este posibil să fie necesare vase de testare suplimentare tratate pentru a facilita determinările analitice la începutul și la sfârșitul testului. În mod similar, atunci când evaluările intermediare sunt considerate necesare, și anume în ziua a 7-a, iar analizele necesită un număr mare de eșantioane de sediment care nu pot fi îndepărtate cu ușurință din sistemul de testare, trebuie să se efectueze determinări analitice folosind vase de testare suplimentare, tratate în același mod precum cele utilizate pentru evaluările biologice.

73. Centrifugarea la, de exemplu, 10 000 g și 4 °C timp de 30 de minute, este recomandată pentru izolarea apei interstițiale. Cu toate acestea, în cazul în care se demonstrează că substanța chimică testată nu se absoarbe în filtre, filtrarea poate fi acceptabilă, de asemenea. În unele cazuri, nu se pot analiza concentrațiile în apa interstițială dacă dimensiunea eșantionului este prea mică.

74. Pentru testele în regim semistatic (și anume, expunerea prin intermediul fazei apoase), în cazul în care concentrația substanței (substanțelor) chimice de testare relevantă(e) nu este preconizată să rămână în intervalul de 20 % din concentrația nominală pe durata testului fără reînnoirea soluțiilor de testare, trebuie să se preleveze probe din soluții de testare folosite și proaspăt preparate pentru analiza concentrației substanței chimice testate la fiecare reînnoire.

75. În cazurile în care concentrația inițială măsurată a substanței testate nu se încadrează în 20 % din valoarea nominală, dar pot fi furnizate probe suficiente care să demonstreze că aceste concentrații inițiale sunt repetabile și stabile (și anume, în intervalul de 80-120 % din concentrația inițială), se pot efectua determinările chimice doar la concentrația cea mai mare de testare și la cea mai scăzută.

76. În toate cazurile, concentrațiile substanței chimice de testare se determină doar la un vas duplicat pentru fiecare concentrație de testare. În mod alternativ, soluțiile de testare ale tuturor probelor duplicat pentru fiecare concentrație pot fi cumulate pentru analiză.

77. Dacă există dovezi că s-a menținut concentrația substanței chimice de testare în intervalul de 20 % din concentrația nominală sau măsurată inițial, pe întreg parcursul perioadei de testare, atunci analiza rezultatelor și derivarea ulterioară a punctelor finale pot fi bazate pe valorile nominale sau măsurate inițial.

▼M7

78. În astfel de cazuri, concentrațiile de efect trebuie să se bazeze pe concentrațiile nominale ale apei sau pe cele măsurate la începutul testului.

79. Cu toate acestea, în cazul în care există dovezi că o concentrație a scăzut (și anume, nu este menținută în limita a 20 % din concentrația nominală sau cea măsurată inițial în compartimentul tratat) pe toată durata testului, este necesar ca analiza rezultatelor să se exprime în funcție de media geometrică a concentrației în timpul expunerii sau în funcție de modelele care descriu declinul concentrației substanței chimice de testare în compartimentul tratat (11).

EVALUAREA DATELOR

80. În cazul în care utilizarea unui solvent/agent de dispersie este necesară, datele provenite din probele de control cu solvenți și cele fără solvenți pot fi cumulate în scopul analizelor statistice, cu condiția ca răspunsurile probelor de control cu solvenți și fără solvenți să nu fie diferite în mod semnificativ din punct de vedere statistic.

Variabile de răspuns

81. Scopul testului este de a determina efectele substanței de testare asupra creșterii vegetative a speciei testate, prin utilizarea a două variabile de răspuns, și anume viteza medie specifică de creștere și randamentul, după cum urmează:

Viteza medie specifică de creștere

82. Această variabilă de răspuns se bazează pe modificări logaritmice de lungime totală a lăstarilor, greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă și greutatea uscată totală a lăstarilor, de-a lungul timpului pentru probele de control și pentru fiecare grup supus tratamentului. Această variabilă se calculează pentru fiecare probă duplicat a fiecărei probe de control și pentru fiecare grup supus tratamentului. Lungimea medie și greutatea celor trei plante per vas de testare (duplicat) și, prin urmare, viteza de creștere pentru fiecare duplicat, trebuie calculate folosind următoarea formulă:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

unde:

μ_{i-j}: viteza medie specifică de creștere de la i la j

N_i: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul i

N_j: variabila de măsurare în vasul de testare sau de control la momentul j

t: perioada de timp de la i la j

83. Din răspunsurile duplicat, o valoare medie a vitezei de creștere în paralel cu estimările variației trebuie calculate pentru fiecare grup de tratament și control.

84. Viteza medie specifică de creștere se calculează pentru întreaga durată a testului (momentul „i” în formula de mai sus este începutul testului, iar momentul „j” este sfârșitul testului). Pentru fiecare concentrație de testare și fiecare probă de control, se calculează o valoare medie pentru viteza medie specifică de creștere în paralel cu estimarea variației.

▼M7

85. Inhibarea procentuală a vitezei de creștere (I_r) poate fi calculată pentru fiecare concentrație de testare (grup supus tratamentului) conform următoarei formule:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

unde:

% Ir: inhibarea procentuală a vitezei medii specifice de creștere

μC: valoarea medie a μ în proba de control

μT: valoarea medie a μ în grupul supus tratamentului

Randamentul

86. Această variabilă de răspuns se bazează pe modificările în lungimea totală a lăstarilor, greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă și greutatea uscată totală a lăstarilor, de-a lungul timpului în probele de control și în fiecare grup supus tratamentului. Inhibarea procentuală medie a randamentului (% Iy) se poate calcula pentru fiecare grup supus tratamentului, după cum urmează:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

unde:

% I_y: reducerea procentuală a randamentului

b_C: biomasa finală minus biomasa inițială pentru grupul de control

b_T: biomasa finală minus biomasa inițială în grupul supus tratamentului

Reprezentare grafică a curbelor concentrație-răspuns

87. Se reprezintă grafic curbele concentrație-răspuns care fac legătura între media procentului de inhibare a variabilei de răspuns (I_r, sau I_y), calculată conform descrierii de mai sus și logaritmul concentrației substanței chimice de testare.

Estimarea EC_x

88. Estimările EC_x (de exemplu, EC_{50}) trebuie să se bazeze atât pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x), cât și pe randament (E_yC_x), fiecare dintre acestea trebuind să se bazeze pe greutatea totală a lăstarilor în stare proaspătă, greutatea totală uscată a lăstarilor și lungimea totală a lăstarilor.

89. Trebuie remarcat că valorile EC_x calculate folosind cele două variabile de răspuns nu sunt comparabile, iar această diferență este recunoscută atunci când se folosesc rezultatele testului. Valorile EC_x bazate pe viteza medie specifică de creștere (E_rC_x) vor fi în cele mai multe cazuri mai mari decât rezultatele bazate pe randament (E_yC_x) – în cazul în care se aderă la condițiile de testare ale prezentei metode de testare – datorită bazei matematice a abordărilor respective. Această diferență nu se va interpreta ca o diferență de sensibilitate între cele două variabile de răspuns, valorile fiind diferite din punct de vedere matematic.

Proceduri statistice

90. Obiectivul este de a obține o relație cantitativă concentrație-răspuns prin analiza regresiei. Este posibilă folosirea unei regresii liniare ponderate după ce s-a efectuat o transformare de liniarizare a datelor de răspuns, de exemplu în funcția probit, logit sau unități Weibull (13), dar procedurile de regresie neliniară sunt tehnici preferate, care tratează mai bine inexactitățile inevitabile ale datelor și abaterile de la distribuțiile netede Atunci când se apropie de zero sau în cazul unei inhibiții totale, aceste inexactități se pot

▼M7

amplifica prin transformare, interferând cu analiza (13). Trebuie remarcat că metodele standard de analiză folosind transformările probit, logit sau Weibull se utilizează în cazul datelor binare (de exemplu, date despre mortalitate sau supraviețuire) și trebuie să fie modificate pentru a putea fi aplicate la datele privind viteza de creștere și randamentul. Procedurile specifice pentru determinarea valorilor EC_x pe baza datelor continue pot fi consultate în referințele (14) (15) (16) (17).

91. Pentru fiecare variabilă de răspuns de analizat, se utilizează relația concentrație-răspuns pentru calcularea estimărilor punctuale ale valorilor EC_x. Limitele de încredere de 95 % pentru fiecare estimare sunt determinate, iar concordanța datelor de răspuns cu modelul de regresie se evaluează în mod grafic sau statistic. Analiza regresiei se efectuează folosind răspunsuri individuale ale probelor duplicat, nu medii ale grupului supus tratamentului.

92. Estimările și limitele de încredere ale EC_{50} pot fi obținute, de asemenea, folosind interpolarea liniară cu „bootstrap” (18), dacă modelele/metodele de regresie disponibile sunt inadecvate pentru date.

93. Pentru estimarea LOEC și, prin urmare, a NOEC, este necesară compararea mediilor probelor supuse tratamentului folosind tehnici de analiză a variației (ANOVA). Media pentru fiecare concentrație se compară apoi cu media probei de control folosind o metodă de testare corespunzătoare (de exemplu, testele Williams sau Dunnett) (19) (20) (21) (22). Este necesar să se evalueze dacă se verifică ipoteza ANOVA de distribuție normală (ND) și de omogenitate a variației (VH). Această evaluare trebuie realizată folosind testul Shapiro-Wilks (ND) sau testul Levene (VH). Neîndeplinirea ipotezei ND sau de omogenitate a variațelor poate fi corectată uneori prin transformarea logaritmică a datelor. Dacă eterogenitatea variației și/sau abaterea de la ND este extremă și nu poate fi corectată prin transformare, se va lua în considerare analiza prin metode precum testul-t Bonferroni-Welch, testul regresiv Jonkheere Terpstra și testul median Bonferroni. Orientări suplimentare privind determinarea NOEC sunt disponibile în referința (16).

RAPORTAREA

94. Raportul de testare include următoarele detalii:

Substanța chimică testată

Substanță mono-constituent:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— identificarea chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc.

substanțe multi-constituent, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Speciile folosite pentru testare:

— denumirea științifică și sursa.

Condițiile de testare

— durata și condițiile fazei de stabilire;

— procedura de testare folosită (statică, semistatică, cu impulsuri);

▼M7

— data începerii testului și durata sa;

— mediul de testare, și anume sedimentul și mediul lichid nutritiv;

— descrierea conceptului experimental: încăperea/camera sau laboratorul de creștere, vasele de testare și capacele, volumele soluțiilor, lungimea și greutatea plantelor de testare per vas de testare la începutul testului, raportul dintre suprafața sedimentului și suprafața apei, raportul dintre volumul sedimentului și al apei;

— concentrațiile de testare (nominale și măsurate după caz) și numărul de probe duplicat per concentrație;

— metodele de preparare a soluțiilor stoc și a soluțiilor de testare, inclusiv folosirea oricărui solvent sau agent de dispersie;

— temperatura în timpul testului;

— sursa de lumină, iradianța ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)

— valorile pH-ului mediilor de testare și de control, precum și aspectul mediilor de testare la începutul și la sfârșitul testului;

— concentrațiile oxigenului;

— metoda de analiză cu date adecvate de evaluare a calității (studii de validare, abateri standard sau limite de încredere ale analizelor);

— metode pentru determinarea variabilelor de măsurare; de exemplu, lungime, greutate uscată, greutate în stare proaspătă;

— orice abatere de la această metodă de testare.

Rezultate

— date brute: lungimea lăstarilor și greutatea lăstarilor plantelor/ghiveci și alte variabile de măsurare în fiecare vas de testare și de control la fiecare observație și ocazie de analiză potrivit programului de evaluare prezentat în tabelul 1;

— mediile și abaterile standard pentru fiecare variabilă de măsurare;

— curbele de creștere pentru fiecare concentrație;

— timpul de duplicare/viteza de creștere în proba de control pe baza lungimii și greutății lăstarilor în stare proaspătă, inclusiv coeficientul de variație pentru randamentul greutății în stare proaspătă;

— variabilele de răspuns calculate pentru fiecare probă duplicat supusă tratamentului, cu valori medii și coeficient de variație pentru probele duplicat;

— reprezentarea grafică a relației concentrație-efect;

— estimările punctelor finale toxice pentru variabilele de răspuns, de exemplu $EC_{50,}$ și intervalele de încredere asociate. dacă au fost calculate, LOEC și/sau NOEC și metodele statistice folosite pentru determinarea acestora;

— dacă s-a folosit analiza ANOVA, dimensiunea efectului care poate fi detectat (de exemplu, diferența minimă semnificativă);

— orice stimulare a creșterii constatată în cazul oricărui tratament;

▼M7

— orice indicii vizuale de fitotoxicitate, precum și observațiile soluțiilor de testare;

— discutarea rezultatelor, inclusiv orice influență asupra rezultatului testului rezultată din abaterile de la această metodă de testare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Capitolul C.26 din prezenta anexă: Test de inhibare a creșterii asupra Lemna sp.

(2) Capitolul C.3 din prezenta anexă: Alge de apă dulce și cianobacterii, test de inhibare a creșterii.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715722.

(7) Capitolul C.50 din prezenta anexă: Test de toxicitate fără sediment asupra *Myriophyllum spicatum*.

(8) Capitolul C.28 din prezenta anexă: Test de toxicitate asupra chironomidelor într-un sistem apă-sediment încărcat.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 – 237.

(11) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Apendicele 1

COMPOZIȚIA MEDIULUI SMART ȘI BARKO

Componentă	Cantitatea de reactiv adăugat în apă (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (principiul echilibrului aerian)	7,9

(*) apă demineralizată (și anume, distilată sau deionizată)

▼M7

Apendicele 2

DEFINIȚII

Biomasă înseamnă greutatea uscată a materiei vii prezentă într-o populație. În acest test, biomasa este suma lăstarului principal, a ramurilor laterale și a tuturor rădăcinilor.

Substanță chimică înseamnă o substanță sau un amestec.

Cloroză înseamnă schimbarea de colorit de la verde la galben a organismului de testare, în special a vârtejurilor.

EC_x înseamnă concentrația substanței chimice de testare dizolvată în mediul de testare din care rezultă o reducere de x % (de exemplu, 50 %) a creșterii *Myriophyllum spicatum* într-o anumită perioadă de expunere (care se menționează explicit în cazul în care există abateri de la durata completă sau normală a testului). Pentru a reprezenta în mod clar o valoare EC derivată din viteza de creștere sau din randament, se folosesc simbolurile „E_rC” pentru viteza de creștere și, respectiv, „E_yC” pentru randament, urmate de variabila de măsurare folosită, de exemplu E_rC (lungimea lăstarului principal).

Creștere înseamnă o mărire a variabilei de măsurare, cum ar fi lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul vârtejurilor, de-a lungul perioadei de testare.

Viteză de creștere (viteza medie specifică de creștere) înseamnă creșterea logaritmică a variabilei de măsurare în timpul perioadei de expunere. *Notă*: Variabilele de răspuns legate de viteza de creștere sunt independente de durata testului atât timp cât tendința de creștere a organismelor de control neexpuse este exponențială.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) înseamnă cea mai scăzută concentrație de testare la care se observă că substanța chimică are un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu proba de control, într-un anumit timp de expunere. Cu toate acestea, toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC trebuie să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când cele două condiții menționate nu pot fi satisfăcute, trebuie furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, NOEC).

Variabile de măsurare înseamnă orice tip de variabile care sunt măsurate pentru a exprima punctul final de testare folosind una sau mai multe variabile de răspuns. În această metodă de testare, lungimea lăstarului principal, lungimea totală a ramurilor laterale, lungimea totală a lăstarilor, lungimea totală a rădăcinii, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată și numărul vârtejurilor reprezintă variabile de măsurare.

Monocultură înseamnă o cultură cu o singură specie de plante.

Necroză înseamnă un țesut mort (și anume, alb sau maro închis) al organismului de testare.

Concentrație la care nu se observă niciun efect (NOEC) înseamnă concentrația de testare situată imediat sub LOEC.

Variabilă de răspuns înseamnă orice variabilă pentru estimarea toxicității derivate din orice variabilă măsurată care descrie biomasa prin diferite metode de calcul. Pentru această metodă de testare, viteza de creștere și randamentul sunt variabile de răspuns derivate din variabile de măsurare precum lungimea lăstarului principal, lungimea totală a lăstarilor, greutatea în stare proaspătă, greutatea uscată sau numărul de vârtejuri.

Test (de reînnoire) semistatic înseamnă un test în care soluția de testare se înlocuiește periodic, la intervale specifice pe durata testului.

Test static înseamnă o metodă de testare care nu presupune reînnoirea soluției de testare pe durata testului.

▼**M7**

Substanță chimică de testare înseamnă orice substanță sau amestec de substanțe testat(ă) utilizând această metodă de testare.

Punctul final de testare descrie factorul general care va fi modificat de substanța chimică de testare în comparație cu proba de control, acesta fiind obiectivul testului. În această metodă de testare, punctul final de testare este inhibarea creșterii, care poate fi exprimată prin diferite variabile de răspuns bazate pe una sau mai multe variabile de măsurare.

Mediu de testare înseamnă mediul de cultură sintetic complet în care cresc plantele testate atunci când sunt expuse la substanța chimică de testare. În mod normal, substanța chimică de testare va fi dizolvată în mediul de testare.

UVCB este o substanță cu compoziție necunoscută sau variabilă, produs de reacție complexă sau material biologic.

Randament reprezintă valoarea unei variabile de măsurare pentru exprimarea biomasei la sfârșitul perioadei de expunere minus variabila de măsurare la începutul perioadei de expunere. Notă: În cazul în care tendința de creștere a organismelor neexpuse este exponențială, variabilele de răspuns bazate de randament vor descrește odată cu durata testului.

▼M8

C.52. STUDIU EXTINS ASUPRA REPRODUCERII PE DURATA UNEI GENERAȚII PENTRU SPECIA MEDAKA (MEDAKA EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTION TEST -MEOGRT)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea (TG) nr. 240 (2015). Studiul extins asupra reproducerii pe durata unei generații pentru specia medaka (MEOGRT) descrie o metodă de testare cuprinzătoare bazată pe expunerea de pești, de-a lungul mai multor generații, pentru a furniza date relevante pentru evaluarea riscurilor ecologice și a riscurilor legate de substanțele chimice, inclusiv substanțe chimice suspectate de a provoca tulburări ale sistemului endocrin (EDC). Expunerea în testul MEOGRT continuă până la ecloziune (timp de două săptămâni după fertilizare, sdf) în cea de a doua generație (F2). Ar fi necesare investigații suplimentare pentru a justifica utilitatea extinderii generației F2 dincolo de momentul ecloziunii; în acest moment, nu există suficiente informații pentru a asigura condițiile sau criteriile relevante care să garanteze extinderea generației F2. Însă această metodă de testare poate fi actualizată pe măsură ce sunt luate în considerare informații și date noi. De exemplu, orientările privind extinderea generației F2 prin reproducere pot fi utile în anumite circumstanțe (de exemplu substanțele chimice cu potențial ridicat de bioconcentrare sau cu indicații privind efecte transgenerațională la alți taxoni). Această metodă de testare poate fi utilizată pentru a evalua efectele cronice potențiale ale substanțelor chimice, inclusiv ale substanțelor chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, asupra peștilor. Metoda pune accent, în principal, pe efectele potențiale relevante asupra populației (și anume, efecte adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și reproducerii) pentru calcularea unei concentrații fără efect observat (CFEO) sau a unei concentrații efective (CEx), deși ar trebui remarcat faptul că abordările CEx sunt rareori adecvate pentru studii ample de acest tip, unde este posibil să nu fie practică o creștere a numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CEx dorite, ceea ce poate cauza, de asemenea, probleme semnificative de bunăstare a animalelor din cauza numărului mare de animale utilizate. Pentru substanțele chimice care nu necesită o evaluare de-a lungul „mai multor generații" sau substanțele chimice care nu sunt substanțe chimice care pot provoca tulburări ale sistemului endocrin, ar putea fi mai adecvate alte metode de testare (1). Specia japoneză medaka este specia potrivită pentru a fi utilizată în cadrul acestei metode de testare, având în vedere ciclul de viață scurt al acesteia și posibilitatea de a-i determina sexul genetic (2), aceasta fiind considerată a fi o componentă esențială în cadrul acestei metode de testare. Metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă sunt aplicabile numai pentru specia japoneză medaka. Alte specii de pești mici (de exemplu, peștele-zebră) pot fi adaptate la un protocol de testare similar.

2. Această metodă de testare măsoară mai multe puncte finale biologice. Se acordă o importanță deosebită efectelor negative potențiale asupra parametrilor relevanți pentru populație, inclusiv supraviețuirea, dezvoltarea brută, creșterea și reproducerea. În al doilea rând, pentru a furniza informații mecaniciste și pentru a asigura o legătură între rezultatele altor tipuri de studii în teren și în laborator, în cazul în care există dovezi *a posteriori* pentru o substanță chimică care declanșează o activitate potențial provocatoare de tulburări ale sistemului endocrin (*de exemplu*, o activitate androgenică sau estrogenică în cadrul altor teste și analize), se obțin alte informații utile prin măsurarea valorii mRNA a *vitelogeninei* (*vtg)* (sau a proteinei vitelogenina, VTG), a caracteristicilor sexuale secundare fenotipice (SSC) aferente sexului genetic, precum și evaluarea histopatologiei. Ar trebui remarcat faptul că, în cazul în care o substanță chimică de testat sau metaboliții săi nu sunt suspectați de a fi EDC, este posibil să nu fie necesară măsurarea acestor puncte finale secundare și ar putea fi adecvate mai puține studii cu utilizare intensivă a resurselor și animalelor (1). Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

▼M8

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou model de studiu, metoda de testare va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. Datele pot fi utilizate la nivelul 5 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea perturbatorilor endocrini (3). Metoda de testare începe prin expunerea peștilor adulți (generația F0) la substanța chimică de testat în faza de reproducere. Expunerea continuă în etapa de dezvoltare și reproducere la generația F1 și de eclozare la generația F2; astfel, testul permite evaluarea atât a parcursului endocrin structural, cât și a celui activațional. O abordare bazată pe forța probantă a datelor poate fi aplicată atunci când se interpretează punctele finale aferente sistemului endocrin.

4. Testul ar trebui să includă un număr adecvat de persoane pentru a asigura o putere suficientă de evaluare a punctelor finale relevante ale reproducerii (a se vedea apendicele 3), asigurându-se în același timp faptul că numărul de animale utilizate constituie minimul necesar din motive de bunăstare a animalelor. Având în vedere numărul mare de animale utilizate pentru testare, este important să se analizeze cu atenție necesitatea efectuării testului în raport cu datele existente care ar putea conține deja informații relevante privind multe dintre punctele finale din MEOGRT. În acest sens, se poate obține asistență în contextul Cadrului OCDE privind testele de toxicitate la pești (1).

5. Metoda de testare a fost concepută în principal pentru a distinge efectele unei singure substanțe. Însă, dacă se impune efectuarea unui test asupra unui amestec, ar trebui luat în considerare dacă acesta va oferi rezultate acceptabile pentru scopul de reglementare prevăzut.

6. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat.

PRINCIPIUL TESTULUI

7. Testul începe prin expunerea masculilor și femelelor mature din punct de vedere sexual (cel puțin 12 sdf) în perechi de reproducere, timp de 3 săptămâni, iar în această perioadă substanța chimică de testat este distribuită în organismul generației parentale (F0) conform comportamentului său toxicocinetic. Cât mai aproape posibil de prima zi a celei de a patra săptămâni, se colectează ouă pentru a începe generația F1. În perioada de creștere a generației F1 (în total 15 săptămâni), se analizează capacitatea de eclozare și supraviețuirea. În plus, peștii sunt incluși în eșantion la 9-10 sdf pentru punctele finale de dezvoltare și se analizează perioada de depunere a icrelor timp de trei săptămâni, de la 12 la 14 sdf. O generație F2 începe după a treia săptămână de la evaluarea reproducerii, aceasta fiind crescută până la încheierea procesului de ecloziune.

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

8. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:

— concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, ≥ 60 % din valoarea saturației aerului;

— Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între 24 °C și 26 °C. Abaterile scurte de la medie în acvarii individuale nu ar trebui să fie mai mari de 2 °C;

▼M8

— Fecunditatea medie a martorilor în fiecare dintre generații (F0 și F1) ar trebui să fie mai mare de 20 de ouă per pereche pe zi. Fertilitatea tuturor ouălor produse în timpul analizei ar trebui să fie mai mare de 80 %. În plus, 16 dintre cele 24 de perechi de reproducere martor recomandate (> 65 %) ar trebui să producă mai mult de 20 de ouă pe pereche pe zi;

— capacitatea de eclozare la martori ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) (pentru fiecare dintre generațiile F1 și F2);

— rata de supraviețuire după eclozare, până la 3 sdf și după 3 sdf, până în etapa finală pentru generația F1 (și anume, 15 sdf) ar trebui să fie ≥ 80 % (medie) și, respectiv, ≥ 90 % (medie), la martori (F1);

— trebuie să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate.

În ceea ce privește temperatura apei, deși nu este un criteriu de validitate, duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

9. Deși se poate observa o scădere a reproducerii la grupurile cu expunere mai mare, ar trebui să existe reproducere suficientă în cel puțin al treilea cel mai mare grup și în toate grupurile mai mici de F0 pentru a umple incubatoarele de eclozare. În plus, ar trebui să existe o rată adecvată de supraviețuire a embrionilor în al treilea cel mai mare grup de expunere și în grupurile mai mici de expunere din F1 pentru a permite evaluarea punctelor finale la eșantionarea subadulților (a se vedea punctele 36 și 38 și apendicele 9). În plus, ar trebui să existe cel puțin un nivel minim de supraviețuire după eclozare (~ 20 %) în cel de al doilea cel mai mare grup de expunere din F1. Acestea nu sunt criterii de validitate, ca atare, ci recomandări pentru a permite calcularea valorilor CFEO sigure.

10. Dacă se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODEI

Aparatură

11. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:

(a) aparat de măsurare a oxigenului și pH-metru;

(b) echipament pentru determinarea durității și alcalinității apei;

(c) aparatură adecvată pentru controlul temperaturii, de preferat cu monitorizare continuă;

(d) rezervoare din material chimic inert și de capacitate adaptată la valorile recomandate de încărcare și densitate a populației (a se vedea apendicele 3);

(e) balanță cu precizie adecvată (mai exact, precizie de ± 0,5 mg).

▼M8

Apă

12. Orice tip de apă în care specia de testat supraviețuiește și crește o perioadă îndelungată în mod corespunzător poate fi utilizată ca apă în scopul testării. Apa ar trebui să prezinte o calitate constantă pe durata testului. Pentru a obține certitudinea că apa de diluție nu influențează în mod necorespunzător rezultatele testelor (de exemplu, prin complexare cu substanța chimică de testat) sau nu afectează negativ comportamentul peștilor reproducători, ar trebui prelevate periodic probe pentru analiză. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, de exemplu la șase luni, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități.

Sistemul de expunere

13. Nu se specifică modelul și materialele utilizate pentru sistemul de expunere. Pentru construirea sistemului de testare ar trebui să se utilizeze sticlă, oțel inoxidabil sau alt material inert din punct de vedere chimic care nu a fost contaminat în cadrul testelor anterioare. În scopurile acestui test, un sistem de expunere adecvat poate fi compus dintr-un sistem cu flux continuu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Soluții de testat

14. Soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie introdusă în sistemul de expunere printr-o pompă corespunzătoare. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră este reînnoită în mod corespunzător (de exemplu, minimum cinci reînnoiri de volum/zi până la 16 reînnoire/zi sau un debit de maxim 20 ml/min flux), în funcție de stabilitatea substanței chimice de testat și de calitatea apei.

15. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluțiile mamă ar trebui să se prepare, de preferință, pur și simplu prin amestecarea sau agitarea substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, agitare și/sau ultrasonificare). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (14). Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „bio-filmare” asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al martorului tratat cu solvent care are implicații asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În cazul substanțelor chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat un solvent, în ultimă instanță, și ar trebui consultat documentul de orientare nr. 23 al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (15) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice privind utilizarea solventului. În cazul în care se utilizează solvenți purtători, ar trebui să se evalueze martori solvenți adecvați, în plus față de martorii non-solvenți (negativi) (doar apa de diluție). În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în

▼M8

martorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în martorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solvenților nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (15) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (*de exemplu*, < 20 µl/l) pentru a se evita efectul potențial al solventului asupra punctelor finale măsurate (16).

Animalele de testare

Selectarea și păstrarea peștelui

16. Specia testată este medaka japoneză *Oryzias latipes*, datorită ciclului său de viață scurt și posibilității de determinare a sexului genetic. Deși alte specii de pești mici pot fi adaptate la un protocol de testare similar, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai pentru medaka japoneză (a se vedea punctul 1). Medaka este indusă cu ușurință pentru a se înmulți în captivitate; există metode publicate pentru cultura sa (17) (18) (19), precum și date din cadrul testelor referitoare la mortalitatea pe termen scurt, la primele stadii de viață și întregul ciclu de viață (5) (6) (8) (9) (20). Toți peștii sunt expuși la lumină timp de 16 ore și 8 ore la întuneric. Peștii vor fi hrăniți cu creveți în saramură vii, specia *Artemia* spp., larve nauplius care pot fi suplimentate cu hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru identificarea contaminanților.

17. Atâta timp cât se respectă practici de creștere adecvate, nu este necesar niciun protocol specific de cultură. De exemplu, peștii medaka pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 240 pești larvari pentru fiecare bazin până la 4 sdf, apoi aceștia pot fi crescuți în bazine de 2 l cu 10 pești per bazin până la 8 sdf, după care sunt transferați în perechi de reproducție în bazine de 2 l.

Aclimatarea și selecția peștilor

18. Peștii pentru testare ar trebui să fie selectați dintr-un singur stoc de laborator care a fost aclimatat timp de cel puțin două săptămâni înainte de test în condiții de calitate a apei și de iluminare similare celor utilizate în cadrul testului (Notă: Această perioadă de aclimatare nu este o perioadă de expunere prealabilă *in situ*). Se recomandă să se obțină pești pentru testare dintr-o cultură internă, deoarece transportul peștilor adulți este stresant și poate afecta reproducerea fiabilă. Peștii ar trebui hrăniți cu creveți în saramură vii, larve nauplius, de două ori pe zi în perioada de deținere și în faza de expunere, hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar. Pentru a iniția acest test și a asigura o replicare adecvată, se consideră că sunt necesare minim 42 de perechi de reproducție (54 de perechi de reproducție în cazul în care este necesar un martor solvent din cauza lipsei unor date istorice care să susțină utilizarea exclusivă a martorului non-solvent). În plus, fiecare pereche de reproducție din generația F0 ar trebui să fie verificată pentru a fi XX-XY (și anume, o relație complementară normală de cromozomi sexuali la fiecare sex) pentru a evita o posibilă includere a masculilor spontani XX (a se vedea punctul 39).

▼M8

19. În faza de aclimatare, ar trebui să se înregistreze mortalitatea la peștii de cultură și să se aplice următoarele criterii după o perioadă de instalare de 48 de ore:

— Mortalitatea mai mare de 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se respinge întregul lot;

— Mortalitatea între 5 % și 10 % la populația de cultură în perioada de șapte zile dinaintea transferului în sistemul de testare: se asigură aclimatarea pentru șapte zile în plus față de perioada de aclimatare de două săptămâni; dacă mortalitatea este peste 5 % în a doua perioadă de șapte zile, se respinge întregul lot;

— Mortalitatea sub 5 % la populația de cultură în perioada de șapte zile premergătoare transferului în sistemul de testare: se acceptă lotul.

20. Peștii nu ar trebui să beneficieze de tratament pentru boli în perioada de două săptămâni de aclimatare dinaintea testului și în perioada de expunere, iar tratarea bolilor ar trebui să fie complet evitată, dacă este posibil. Peștii cu semne clinice de boală nu ar trebui utilizați în cadrul studiului. Ar trebui să fie păstrată o evidență a observațiilor și a oricăror tratamente profilactice și terapeutice în perioada de cultură premergătoare testului.

21. Faza de expunere ar trebui să fie inițiată cu pești adulți având sexul genetic stabilit, care sunt dismorfici sexual, din rezerva laboratorului de animale mature din punct de vedere reproductiv și crescute la o temperatură de 25 ± 2 °C. Peștii ar trebui identificați ca reproducători dovediți (și anume, să fi produs progenituri viabile) în săptămâna premergătoare expunerii. Pentru întregul grup de pești utilizat în cadrul testului, intervalul greutăților individuale pe sexe la începutul testului ar trebui menținut în limitele de ± 20 % din media aritmetică a greutății la același sex. Un subeșantion de pești ar trebui cântărit înainte de test pentru a estima greutatea medie. Peștele selecționat ar trebui să fie de cel puțin 12 sdf, având o greutate de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

22. Se recomandă utilizarea a cinci concentrații de substanțe chimice, plus martor(i). Toate sursele de informații ar trebui să fie luate în considerare atunci când se selectează intervalul concentrațiilor de testare, inclusiv relațiile cantitative structură-activitate (QSAR), datele extrapolate din teste analoage, rezultatele testelor pe pești, cum ar fi testele privind toxicitatea acută (capitolul C.1 din prezenta anexă), testul de reproducere a peștilor pe termen scurt (capitolul C.48 din prezenta anexă) și alte metode de testare, de exemplu, capitolele C.15, C.37, C.41, C.47 sau C.49 din prezenta anexă (21) (22) (23) (24) (25) (26), dacă există, sau, dacă este necesar, dintr-un test de stabilire a intervalului care ar putea include o fază de reproducere. Dacă este necesar, testul de stabilire a intervalului poate fi efectuat în condiții (calitatea apei, sistemul de testare, aportul de animale) similare cu cele utilizate pentru testul definitiv. În cazul în care este necesară utilizarea unui solvent și nu sunt disponibile date istorice, testul de stabilire a intervalului poate fi utilizat pentru identificarea caracterului adecvat al solventului. Concentrația cea mai mare de testare nu ar trebui să depășească solubilitatea în apă, 10 mg/l sau 1/10 din 96h-LC50 (27). Concentrația cea mai scăzută ar trebui să fie un factor de 10 până la 100 de ori mai mic decât cea mai mare concentrație. Utilizarea a cinci concentrații în cadrul acestui test permite nu numai măsurarea relațiilor doză-răspuns, ci și determinarea concentrației celei mai scăzute pentru care este observat un efect (LOEC) și CFEO, care sunt necesare pentru evaluarea riscurilor în cadrul anumitor

▼M8

programe sau jurisdicții de reglementare. În general, factorul de separare dintre concentrații nominale ale substanței chimice de testat între niveluri de tratament adiacente este ≤ 3,2.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

23. Ar trebui să fie utilizate minim șase camere de testare duplicate pentru fiecare concentrație de testare (a se vedea apendicele 7). În faza de reproducere (cu excepția generației F0), structura de replicare este dublată pentru evaluarea fecundității și fiecare duplicat are doar o singură pereche de reproducție (a se vedea punctul 42).

24. Pe lângă concentrațiile de testat, ar trebui să fie supuse testării un martor apă de diluție și, dacă este necesar, un martor solvent. Ar trebui să se utilizeze un număr dublat de camere duplicate pentru martori pentru a asigura o putere statistică adecvată (și anume, pentru martori ar trebui să fie utilizate cel puțin douăsprezece duplicate). În faza de reproducere, numărul duplicatelor din martori sunt dublate (și anume, minim 24 de duplicate și fiecare duplicat are o singură pereche de reproducție). În urma reproducerii, duplicatele martori ar trebui să conțină cel mult 20 de embrioni (pește).

PROCEDURA

Începerea testului

25. Peștele adult activ din punct de vedere reproductiv, care este utilizat pentru începerea generației F0 în cadrul testului, este selectat pe baza a două criterii: vârsta (de obicei peste 12 sdf, dar se recomandă să nu se depășească 16 sdf) și greutatea (ar trebui să fie de ≥ 300 mg în cazul femelelor și de ≥ 250 mg în cazul masculilor).

26. Perechile femele-masculi care corespund specificațiilor de mai sus sunt mutate ca perechi individuale în fiecare duplicat din bazin, și anume douăsprezece duplicate în martori și șase duplicate în tratamente chimice la începutul testului. Acestor bazine li se distribuie în mod aleatoriu un tratament (de exemplu, T1-T5 și martor) și un duplicat (de exemplu, A-L la martori și A-F la tratament), iar apoi sunt introduse în sistemul de expunere cu debitul adecvat pentru fiecare bazin.

Condiții de expunere

27. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor și condițiilor de testare. Respectarea acestor specificații ar trebui să aibă drept rezultat existența unor valori ale punctelor finale la peștii martor similare cu cele enumerate în apendicele 4.

28. În timpul testului, oxigenul dizolvat, pH-ul și temperatura ar trebui să fie măsurate în cel puțin un vas de testare al fiecărui grup de tratament și martor. Ca și cerințe minime, aceste măsurători, cu excepția temperaturii, ar trebui efectuate o dată pe săptămână în perioada de expunere. Temperatura medie a apei pe întreaga durată a studiului ar trebui să fie cuprinsă între 24 °C și 26 °C pe parcursul testării. Temperatura ar trebui să fie măsurată în fiecare zi în perioada de expunere. pH-ul apei ar trebui să fie cuprins în intervalul 6,5-8,5, dar pe durata unui anumit test, acesta ar trebui să se încadreze într-un interval de ± 0,5 unități. Duplicatele în cadrul unui tratament nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic, iar grupurile de tratament din cadrul testului nu ar trebui să fie diferite unele față de altele din punct de vedere statistic (pe baza măsurătorilor de temperatură zilnice și excluzând abaterile de scurtă durată).

▼M8

Durata expunerii

29. Testul expune pești reproducători sexual din generația F0 timp de trei săptămâni. În săptămâna 4, aproximativ în ziua de testare 24, se stabilește F1, iar perechile de reproducție F0 sunt eutanasiate, fiind înregistrate greutatea și lungimea (a se vedea punctul 34). Aceasta este urmată de expunerea generației F1 timp de alte 14 săptămâni (în total 15 săptămâni pentru generația F1) și a generației F2 timp de două săptămâni până la eclozare. Durata totală a testului este de 19 săptămâni (și anume, până la eclozarea F2). Calendarele pentru testare sunt prezentate în tabelul 2 și explicate în detaliu în apendicele 9.

Regimul de hrănire

30. Peștii pot fi hrăniți cu creveți în saramură *Artemia* spp. (larve nauplii de 24 de ore) *ad libitum*, fiind asigurat un supliment de hrană sub formă de fulgi din comerț, dacă este necesar. Hrana sub formă de fulgi din comerț ar trebui analizată în mod regulat pentru detectarea contaminanților precum pesticidele organoclorurate, hidrocarburile aromatice policiclice (HAP), bifenilii policloruraţi (PCB). Ar trebui să se evite produsele alimentare cu un nivel ridicat de substanțe active endocrin (și anume fitoestrogeni) care ar putea compromite răspunsul testului. Hrana neconsumată și materiile fecale ar trebui înlăturate din vasele de testare, după caz, de exemplu prin curățarea cu atenție a fundului fiecărui bazin cu ajutorul unui sifon. Părțile laterale și partea inferioară a fiecărui bazin ar trebui, de asemenea, să fie curățate o dată sau de două ori pe săptămână (de exemplu, prin răzuire cu o spatulă). Un exemplu de program de hrănire se găsește în apendicele 5. Rata de hrănire depinde de numărul de pești per duplicat. Prin urmare, se reduce rata de hrănire dacă există cazuri de mortalitate într-un duplicat.

Determinare analitică și măsurători

31. Înainte de începerea perioadei de expunere, ar trebui asigurată funcționarea corespunzătoare a sistemului de alimentare cu substanța chimică. Ar trebui stabilite toate metodele analitice necesare, inclusiv cunoștințe suficiente privind stabilitatea substanței chimice în cadrul sistemului de testare. În timpul testării, concentrațiile substanței chimice de testare se determină la intervale adecvate, de preferință cel puțin o dată pe săptămână, într-un duplicat, pentru fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână.

32. În timpul testării, debitele diluantului și ale soluției mamă ar trebui verificate periodic în mod corespunzător (de exemplu, cel puțin de trei ori pe săptămână). Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația substanței chimice de testat în soluție a fost menținută la un nivel satisfăcător în intervalul ± 20 % din media valorilor măsurate pe durata testului, atunci rezultatele pot fi bazate fie pe valorile nominale, fie pe valorile măsurate. În cazul substanțelor chimice care se acumulează în pești în mod semnificativ, concentrațiile de testare pot scădea pe măsură ce peștii cresc. În astfel de cazuri, se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testat din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare cât mai constant posibil.

Observații și puncte finale măsurate

33. Punctele finale măsurate includ fecunditatea, fertilitatea, eclozarea, creșterea și supraviețuirea pentru evaluarea unor posibile efecte asupra populației. De asemenea, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. Alte puncte finale mecanistice includ nivelurile mRNA hepatice ale *vtg* sau nivelurile de proteine VTG determinate prin imunodozare (28), markeri fenotipici sexuali, cum ar fi papilele înotătoarelor anale caracteristice masculilor, evaluarea histologică a sexului gonadal și evaluarea histopatologică a rinichilor, ficatului și gonadei (a se vedea lista punctelor finale din tabelul 1). Toate aceste puncte finale specifice sunt evaluate în contextul determinării sexului genetic al individului, pe baza prezenței sau absenței sexului

▼M8

masculin la specia medaka, ce determină valoarea *dmy* a genei (a se vedea punctul 41). În plus, este evaluat timpul necesar pentru reproducere. În plus, pot fi derivate raporturi sexuale fenotipice simple pe baza informațiilor obținute din numărarea papilelor înotătoarelor anale pentru ca fiecare pește medaka să fie identificat ca fiind fie mascul, fie femelă fenotipică. Nu ar fi de așteptat ca prin această metodă de testare să se detecteze abaterile modeste din rata de sex preconizată, deoarece numărul relativ mic de pești per duplicat nu va asigura o suficientă putere statistică. De asemenea, în cursul evaluării histopatologice, gonada este evaluată și sunt efectuate analize mult mai pertinente pentru evaluarea fenotipului gonadei în contextul sexului genetic.

34. Scopul principal al acestei metode de testare este de a evalua efectele potențiale relevante asupra populației ale unei substanțe chimice de testat. Punctele finale mecaniciste (VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot, de asemenea, să contribuie la determinarea măsurii în care orice efect este mediat prin intermediul activității endocrine. Însă, aceste puncte finale mecanistice pot fi, de asemenea, influențate de probleme sistemice sau alte tipuri de toxicitate. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate.

Eutanasierea peștilor

35. La finalul expunerii generațiilor F0 și F1 și atunci când se constituie sub-eșantioane de pești subadulți, peștii ar trebui să fie eutanasiați cu cantități adecvate de soluție anestezică [de exemplu, metan sulfonat de tricaină, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l] cu o soluție tampon de 300 mg/l $NaHCO_3$ (bicarbonat de sodiu, CAS.144-55-8) pentru a reduce iritația membranei mucoase. În cazul în care peștii manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când un pește este eutanasiat din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care peștele este eutanasiat în timpul studiului, se poate proceda la reținerea peștelui pentru analiza histopatologică (fixarea peștelui pentru o posibilă histopatologie).

Manipularea ouălor și a larvelor de pește

Colectarea ouălor de la perechile de reproducție pentru a propaga următoarea generație

36. Colectarea ouălor se face în prima zi (sau în primele două zile, dacă este necesar) a săptămânii de testare 4 pentru a trece de la F0 la F1 și a săptămânii de testare 18 pentru a trece de la F1 la F2. Săptămâna de testare 18 corespunde peștilor adulți din generația F1, 15 sdf (săptămâni după fertilizare). Este important ca toate icrele să fie eliminate din fiecare bazin cu o zi înainte de începerea colectării acestora pentru a asigura faptul că toate icrele colectate de la o pereche de reproducție provin de la o singură depunere de icre. În urma depunerii icrelor, femelele medaka își poartă uneori icrele aproape de anus până când acestea pot fi depozitate pe un substrat. În absența unui substrat în bazin, icrele se găsesc fie atașate de o femelă, fie pe partea inferioară a bazinului. În funcție de locul în care se află, icrele sunt fie îndepărtate cu grijă de femelă, fie sifonate de la partea inferioară în săptămâna de testare 4 a generației F0 și în săptămâna de testare 18 a generației F1. Toate icrele colectate în cadrul unui tratament sunt adunate la un loc înainte de a fi distribuite la camerele de incubare.

▼M8

37. Filamentele din ouă, care țin ouăle depuse laolaltă, ar trebui îndepărtate. Icrele fertilizate (maxim 20) sunt colectate de la fiecare pereche de reproducție (1 pereche per duplicat), sunt adunate la un loc prin tratament și distribuite în mod sistematic în camere de incubare corespunzătoare (apendicele 6, 7). Cu ajutorul unui microscop de disecție de bună calitate, se pot vedea semnele fertilizării/dezvoltare precoce, cum ar fi ridicarea membranei de fertilizare (corion), diviziunea celulară continuă sau formarea blastulei. Camerele de incubare pot fi introduse în acvarii de tip „incubator” montate separat pentru fiecare tratament (caz în care trebuie să se măsoare parametrii de calitate a apei și concentrațiile substanței chimice de testat în acestea) sau în acvariul cu duplicate în care vor fi păstrate larvele eclozate (*de exemplu*, embrionul eclozat) vor fi limitate. În cazul în care este necesară o a doua zi de colectare (ziua de testare 23), toate icrele din ambele zile ar trebui să fie grupate și apoi redistribuite în mod sistematic în fiecare dintre duplicatele pentru tratament.

Creșterea icrelor până la eclozare

38. Icrele fertilizate sunt agitate în mod continuu, *de exemplu*, în incubatorul de icre prin intermediul bulelor de aer sau prin balansarea verticală a incubatorului de icre. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (apendicele 9). În a șaptea zi după fertilizare (zdf), agitarea este oprită sau redusă astfel încât icrele fertilizate să se depună pe partea inferioară a incubatorului. Astfel se promovează eclozarea, de regulă în următoarea sau următoarele două zile. Pentru fiecare tratament și martor, sunt numărate larvele (larve tinere; embrioni eclozați) (baza de duplicate). Ouăle fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubației din martor (de regulă, 16 sau 18 zdf) se consideră neviabile și sunt eliminate.

39. În fiecare bazin duplicat se transferă douăsprezece larve. Larvele din camerele de incubație sunt grupate și distribuite în mod sistematic în bazine duplicate (apendicele 7). Acest lucru se poate realiza prin selectarea aleatorie a unei larve din rezerva de tratament și prin adăugarea secvențială a unei larve, printr-o extragere nediferențiată, într-un acvariu duplicat. Fiecare din bazine ar trebui să conțină un număr egal (n = 12) de larve eclozate (maximum 20 de larve fiecare). Dacă nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele pentru tratament, se recomandă să se asigure un număr cât mai mare posibil de duplicate cu 12 larve. Larvele pot fi manipulate în condiții de siguranță cu pipete din sticlă cu diametru mare. Larvele suplimentare sunt eutanasiate cu anestezici. Pe parcursul celor câteva săptămâni anterioare formării perechilor de reproducție, ar trebui să se înregistreze ziua în care se observă primul eveniment de reproducere în fiecare duplicat.

Formarea perechilor de reproducție

Tăierea înotătoarelor și determinarea sexului genotipic

40. Determinarea sexului genotipic prin tăierea unor părți din înotătoare se realizează la 9-10 sdf (și anume, săptămâna de testare 12-13 pentru generația F1). Toți peștii dintr-un bazin sunt anesteziați (folosind metode aprobate, de exemplu, IACUC) și se prelevă o mică probă de țesut din extremitatea dorsală sau ventrală a înotătoarei caudale a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al exemplarului (29). Peștii dintr-un duplicat pot fi adăpostiți în cuști mici, dacă este posibil unul în fiecare cușcă, în bazinul duplicat. În mod alternativ, doi pești pot fi ținuți în fiecare cușcă dacă se pot diferenția unul de celălalt. Una dintre metode este de să se taie în mod diferențiat înotătoarea caudală (*de exemplu*, extremitatea dorsală față de cea ventrală) atunci când se prelevă proba de țesut.

▼M8

41. Sexul genotipic al speciei medaka este determinat de o genă identificată și încadrată într-un șir (*dmy*) care este situată pe cromozomul Y. Prezența *dmy* indică un exemplar XY, indiferent de fenotip, iar absența *dmy* indică un exemplar XX, indiferent de fenotip (30); (31). Acidul dezoxiribonucleic (ADN) din fiecare tăiere a înotătoarei este extrasă, iar prezența sau absența *dmy* poate fi determinată prin metode de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (a se vedea apendicele 9 din capitolul C.41 din prezenta anexă sau apendicele 3 și 4 de la punctul 29).

Stabilirea perechilor de reproducție

42. Informațiile privind sexul genotipic sunt utilizate pentru a stabili perechile de reproducție XX-XY, indiferent de fenotipul extern care poate fi modificat prin expunerea la o substanță chimică de testat. În ziua următoare celei în care se determină sexul genotipic al fiecărui pește, se aleg în mod aleatoriu doi pești XX și doi pești XY provenind din fiecare duplicat și se stabilesc două perechi de reproducție XX-XY. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY, ar trebui să se obțină pești adecvați din alte duplicate în cadrul tratamentului. Prioritatea este de a obține numărul recomandat de perechi de reproducție duplicate (12) pentru fiecare tratament și pentru martori (24). Peștii cu anomalii evidente (probleme ce țin de vezica urinară, deformări ale coloanei vertebrale, variații de mărime extreme etc.) ar fi excluși de la stabilirea perechilor de reproducție. În faza de reproducere pentru F1, fiecare bazin duplicat ar trebui să conțină numai o pereche de reproducție.

Eșantionarea subadulților și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de non-reproducție

43. După constituirea perechilor de reproducție, peștii neselectați pentru reproducere ulterioară sunt eutanasiați pentru măsurarea punctelor finale ale subadulților în săptămâna de testare 12-13 (F1). Este extrem de important ca peștii să fie manipulați în așa fel încât sexul genotipic determinat pentru selecția perechilor de reproducție să poată fi încă depistat la un exemplar. Toate datele colectate sunt analizate în contextul sexului genotipic al peștelui specific. Fiecare pește este utilizat pentru o varietate de măsurători ale punctelor finale, inclusiv: determinarea ratelor de supraviețuire în cazul peștilor tineri/subadulți (săptămânile de testare 7-12/13 (F1), a creșterii în lungime (se poate măsura lungimea standard dacă înotătoarea caudală a fost scurtată ca urmare a prelevării de probe pentru analiza sexului genetic. Lungimea totală poate fi măsurată în cazul în care numai o porțiune a înotătoarei caudale, cea dorsală sau ventrală, este eșantionată pentru *dmy*, precum și masa corporală (și anume, masa umedă, uscare prin tamponare), valoarea mRNA a *vtg* (sau VTG) și papilele anale ale înotătoarelor (a se vedea tabelele 1 și 2). Este de precizat că greutatea și lungimea perechilor de reproducție sunt necesare, de asemenea, pentru calcularea creșterii medii în cadrul unui grup supus tratamentului.

Eșantionarea țesutului și măsurarea vitelogeninei

44. Ficatul este disecat și ar trebui să fie păstrat la ≤ –70 °C până la măsurarea mRNA a *vtg* (sau VTG). Coada peștelui, inclusiv înotătoarea anală, este păstrată într-o soluție fixativă adecvată (de exemplu, Davidson's) sau fotografiată astfel încât papilele înotătoarei anale să fie luate în calcul la o dată ulterioară. [Dacă se dorește, pot fi prelevate alte țesuturi (și anume, gonada) și păstrate în acest moment.] Concentrația VTG din ficat ar trebui să fie cuantificată printr-o tehnică ELISA omoloagă (a se vedea procedurile recomandate pentru medaka în apendicele 6 din capitolul C.48 din prezenta anexă). În mod alternativ, metodele pentru cuantificarea valorii mRNA a vtg, și anume, extragerea mRNA a genei *vtg I* dintr-o probă de ficat și cuantificarea numărului copiilor genei *vtg I* (per ng de mRNA total) prin reacția PCR cantitativă, au fost stabilite de Agenția SUA pentru protecția mediului (29). În locul determinării numărului de copii ale

▼M8

genei *vtg* în grupurile martor și de tratament, o metodă mai accesibilă din punctul de vedere al resurselor și mai puțin dificilă din punct de vedere tehnic va stabili modificarea relativă (multiplicarea) a expresiei *vtg I* în grupurile martor și de tratament.

Caracteristici sexuale secundare

45. În condiții normale, numai peștii medaka masculi care sunt maturi din punct de vedere sexual sunt prevăzuți cu papile care se dezvoltă pe plăcile unite ale anumitor raze ale înotătoarei anale ca o caracteristică sexuală secundară, oferind un posibil marker biologic pentru efectele perturbatoare ale sistemului endocrin. Metoda de contabilizare a papilelor înotătoarei anale (numărul de plăci unite cu papile) este prezentată în apendicele 8. De asemenea, numărul papilelor înotătoarei anale per exemplar este utilizat pentru a clasifica respectivul exemplar ca și mascul sau femelă fenotipic(ă) la nivel extern în vederea calculării unui raport al sexului simplu per duplicat. Un pește medaka cu orice număr mai mare de 0 este definit ca fiind mascul; un pește medaka cu zero papile ale înotătoarei anale este definit ca fiind femelă.

Evaluarea fecundității și a fertilității

46. Fecunditatea și fertilitatea sunt evaluate în săptămânile de testare 1-3 la generația F0 și în săptămânile de testare 15-17 la generația F1. Ouăle sunt colectate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție timp de 21 de zile consecutiv. Ouăle sunt ușor eliminate de la femelele prinse în plasă și/sau sifonate de la partea inferioară a acvariului în fiecare dimineață. Fecunditatea și fertilitatea sunt înregistrate zilnic pentru fiecare pereche de reproducție duplicat. Fecunditatea este definită ca fiind numărul de ouă depuse, iar fertilitatea este definită din punct de vedere funcțional ca fiind numărul de ouă fertilizate și viabile în momentul numărării. Numărătoarea ar trebui efectuată cât mai curând posibil după colectarea ouălor.

47. Fecunditatea duplicată este înregistrată zilnic ca fiind numărul de ouă per pereche de reproducție care se analizează prin procedurile statistice recomandate folosind mediile duplicate. Fertilitatea duplicată reprezintă suma numărului de ouă fertile produse de o pereche de reproducție împărțită la suma numărului de ouă produse de perechea respectivă. Din punct de vedere statistic, fertilitatea este analizată ca procent per duplicat. Capacitatea de eclozare duplicată este numărul de larve împărțit la numărul de embrioni încărcați (de regulă, 20). Din punct de vedere statistic, capacitatea de eclozare este analizată ca procent per duplicat.

Eșantionarea adulților și evaluarea punctelor finale

Eșantionarea peștilor din perechea de reproducție

48. După săptămâna de testare 17 (și anume, după lansarea cu succes a generației F2), adulții F1 sunt eutanasiați și se evaluează diverse puncte finale (a se vedea tabelele 1 și 2). Înotătoarea anală este procesată imagistic pentru evaluarea papilelor înotătoarei anale (a se vedea apendicele 8) și/sau coada, imediat din spatele anusului, este îndepărtată și fixată pentru numărarea ulterioară a papilelor. O porțiune a înotătoarei caudale poate fi eșantionată și arhivată în acest moment pentru verificarea sexului genetic (*dmy*), dacă se dorește. Dacă este necesar, se poate preleva o probă de țesut pentru a repeta analiza *dmy* pentru verificarea sexului genetic al anumitor pești. Se deschide cavitatea corpului pentru a permite perfuzarea cu soluții fixative adecvate (de exemplu, Davidson's) înainte de submersarea întregului corp în soluția fixativă. Însă, în cazul în care se parcurge o etapă adecvată de permeabilizare înainte de fixare, nu este necesar să se deschidă cavitatea corpului.

▼M8

Histopatologie

49. Fiecare pește este evaluat histologic pentru patologie în țesutul gonadal (30); (29). Astfel cum este menționat la punctul 33, alte puncte finale mecanistice evaluate în cadrul acestui test (și anume, VTG, SSC și anumite efecte histopatologice ale gonadelor) pot fi influențate de toxicități sistemice sau de altă natură. În consecință, histopatologia ficatului și a rinichilor poate fi, de asemenea, evaluată în detaliu, pentru a contribui la o mai bună înțelegere a oricăror răspunsuri de la nivelul punctelor finale mecaniciste. Însă, chiar dacă nu sunt efectuate aceste evaluări detaliate, anomaliile brute observate incidental în evaluarea histopatologică ar trebui totuși observate și raportate. Ar putea fi avută în vedere „citirea de sus în jos" de la cel mai mare grup de tratament (comparativ cu martorul) la un tratament fără efect, însă se recomandă consultarea ghidului privind histopatologia (29). De regulă, toate probele sunt prelucrate/secționate, după care sunt citite de patolog. În cazul în care se utilizează o abordare de „citire de sus în jos", se observă că procedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) aplică principiul bazat pe așteptarea conform căreia, pe măsură ce cresc nivelurile dozei, va crește, de asemenea, impactul biologic (patologia). Prin urmare, se va pierde putere dacă se ia în considerare doar o singură doză, cea mai mare, fără dozele intermediare. În cazul în care nu este necesară o analiză statistică pentru a determina dacă doza mare nu produce efecte, atunci această abordare poate fi acceptabilă. Fenotipul gonadei este, de asemenea, derivat din această evaluare

Alte observații

50. MEOGRT furnizează date care pot fi utilizate (de exemplu, în cadrul unei abordări bazate pe forța probantă a datelor) pentru a evalua simultan cel puțin două tipuri generale de parcursuri ale răspunsurilor adverse (AOP) care culminează cu deficiența de reproducere: (a) parcursuri mediate de sistemul endocrin, implicând perturbarea axului hipotalamo-hipofizo-gonadal (HPG) endocrin; și (b) parcursurile care determină reduceri în ceea ce privește supraviețuirea, creșterea (lungime și greutate) și reproducerea prin toxicitate nemediată de sistemul endocrin. Punctele finale măsurate, de regulă, în testele de toxicitate cronică, cum ar fi testul privind întregul ciclu de viață și testul privind etapele de viață timpurii sunt, de asemenea, incluse în acest test și pot fi utilizate pentru a evalua pericolele prezentate atât de modurile de acțiune toxică nemediată de sistemul endocrin, cât și de parcursurile de toxicitate mediată de sistemul endocrin. În timpul testului, ar trebui să se emită zilnic observații cu privire la comportament, iar orice comportament neobișnuit ar trebui să fie notat. În plus, orice mortalitate ar trebui să fie înregistrată și ar trebui să fie calculată supraviețuirea până la sacrificarea peștilor (săptămâna 6/7), supraviețuirea după sacrificarea la eșantionul de subadulți (în 9-10 sdf) și supraviețuirea de la momentul realizării de perechi până la prelevarea de probe de la pești adulți.

Tabelul 1

Prezentarea punctelor finale ale MEOGRT (*)

Etapa de viață	Punct final	Generație
Embrion (2 sdf)	Eclozare (% și timp până la eclozare)	F1, F2
Exemplare tinere (4 sdf)	Supraviețuire	F1
Subadult (9 sau 10 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	

▼M8

Etapa de viață	Punct final	Generație
	Vitelogenină (mRNA sau proteină)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotătoare anală)	
	Procent sex extern	
	Timp până la prima depunere	
Adult (12-14 sdf)	Reproducere (fecunditate și fertilitate)	F0, F1
Adult (15 sdf)	Supraviețuire	F1
	Creștere (lungime și greutate)	
	Caracteristici sexuale secundare (papilă înotătoare anală)	
	Histopatologie (gonadă, ficat, rinichi)	

(*) Aceste puncte finale trebuie să fie analizate din punct de vedere statistic

CALENDAR

51. Un calendar pentru MEOGRT ilustrat în tabelul 2 arată testul. MEOGRT cuprinde 4 săptămâni de expunere la adulții din F0 și 15 săptămâni de expunere la generația F1, precum și perioada de expunere pentru cea de a doua generație (F2), până la ecloziune (2 sdf). Activitatea desfășurată pe parcursul MEOGRT este sintetizată în apendicele 9.

Tabelul 2

Calendarele pentru expunere și punctele finale de măsurare pentru MEOGRT

Calendarul MEOGRT pentru expunere și puncte finale

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Săptămâna de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Etapa de viață cheie					**Embrion**					**Larve**					**Exemplare tinere**			**Subadult**	**Adult**
Puncte finale																			
Fecunditate	F_0														F_1				
Fertilitate	F_0														F_1				
Eclozare					F_1														F_2
Supraviețuire						F_1						F_1						F_1	
Creștere				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenină												F_1							
Sex secundar												F_1						F_1	
Histopatologie																		F_1	
Săptămâna de testare	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Modelul experimental cuprinde 7 grupuri de duplicate
  - 5 pentru tratamente cu substanțe chimice de testat
  - 2 pentru tratamente cu martor (4, în cazul în care se utilizează solvent)
- Model în cadrul grupului
  - 12 duplicate pentru reproducere, patologie pentru adulți și SSC (săpt. 10-18)
  - 6 duplicate pentru eclozare, supraviețuire, vtg; și - SSC și creștere subadulți (săpt. 1-9)

SSC: caracteristici sexuale secundare;
Săpt.: săptămâni;
Vtg: vitelogenină

▼M8

DATE ȘI RAPORTARE

Analiza statistică

52. Întrucât sexul genotipic este determinat la toți peștii pentru testare, datele ar trebui să fie analizate separat pentru fiecare sex genotipic (și anume, masculi XY și femele XX). În cazul în care acest lucru nu este posibil, puterea statistică a oricărei analize va fi redusă considerabil. Analizele statistice ale datelor ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul OCDE intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (32) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare) (32). Apendicele 10 oferă orientări suplimentare pentru analiza statistică.

53. Modelul testului și selecția testelor statistice ar trebui să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care CFEO va fi raportată (32). Este posibil ca raportarea unor concentrații de efect și a unor parametri relevanți să depindă de un cadru de reglementare. Ar trebui să se identifice variația procentuală la fiecare punct final care este important de detectat sau estimat. Modelul testului trebuie adaptat pentru a permite acest lucru. Este posibil să nu se aplice aceeași variație procentuală la toate punctele finale și să nu poată fi conceput un experiment fezabil care să îndeplinească aceste criterii pentru toate punctele finale. Prin urmare, este important ca atenția să fie îndreptată asupra punctelor finale pentru experimentul respectiv în vederea unei proiectări adecvate a experimentului. În apendicele 10 este disponibilă o diagramă statistică și orientări pentru a ajuta la tratarea datelor și la alegerea celui mai adecvat test sau model statistic pentru a fi utilizat. Pot fi utilizate alte abordări statistice, cu condiția ca acestea să fie justificate din punct de vedere științific.

54. Va fi necesar ca variațiile să fie analizate în cadrul fiecărui set de probe duplicat folosind analiza variației sau procedurile tabelelor de contingență, precum și metode adecvate și suficiente de analiză statistică pe baza acestei analize. Pentru a realiza o comparație multiplă între rezultatele obținute la concentrații individuale și cele pentru martori, se recomandă procedura de tip „step-down" (de exemplu, testul Jonckheere-Terpstra) pentru răspunsuri continue. În cazul în care datele nu sunt consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, ar trebui să se utilizeze testul Dunnett sau Dunn (după o transformare adecvată a datelor, dacă este necesar).

55. Pentru fecunditate, ouăle sunt numărate zilnic, dar pot fi analizate ca număr total de ouă sau ca măsură repetată. Apendicele 10 prezintă detaliile privind modul în care este analizat acest punct final. Pentru datele privind histopatologia, care sunt sub formă de punctaje de gravitate, a fost elaborat un nou test statistic, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RISCABS) (33).

56. Ar trebui să fie raportate orice puncte finale observate în tratamentele chimice care sunt semnificativ diferite de martorii corespunzători.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea nivelurilor de tratament compromise

57. O serie de factori sunt luați în considerare atunci când se stabilește dacă un duplicat sau întregul tratament demonstrează toxicitate evidentă, iar acesta ar trebui să fie exclus de la analiză. Toxicitatea evidentă este definită ca > 4 cazuri de mortalitate în orice duplicat între 3 și 9 sdf, care nu poate fi explicată prin eroare tehnică. Alte semne ale toxicității evidente includ hemoragia, comportamentele anormale, modalitățile anormale de înot, anorexia și orice alte semne clinice de boală. În ceea ce privește semnele subletale de

▼M8

toxicitate, ar putea fi necesare evaluări calitative care ar trebui întotdeauna efectuate în raport cu un grup de martori dintr-un vas cu apă de diluție (exclusiv apă curată). În cazul în care se observă toxicitatea evidentă la tratamentul (tratamentele) de la cel mai înalt nivel, se recomandă ca tratamentele respective să fie cenzurate de la analiză.

Martori solvent

58. Utilizarea unui solvent ar trebui avută în vedere doar ca ultimă soluție, după epuizarea tuturor celorlalte opțiuni de livrare a substanței chimice. În cazul utilizării unui solvent, ar trebui să se utilizeze concomitent o apă de diluție. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului. Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

Raportul testului

59. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat: proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;

— Date de identificare a substanței chimice.

Substanță monocomponentă:

— aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

— datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

— în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specii de testare:

— numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.

Condiții de testare:

— Perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— Modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul larvelor pe duplicat);

▼M8

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);

— eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorile măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;

— concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;

— calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;

— informații detaliate legate de hrană [de exemplu, tipul de alimente, sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

— dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile generale de validare;

— datele pentru martor (plus martorul tratat cu solvent atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează, eclozarea (capacitatea de eclozare și timpul până la eclozare) pentru F1 și F2, rata de supraviețuire după eclozare pentru F1, creșterea (lungimea și greutatea corporală) pentru F1, sexul genotipic și diferențierea sexuală (de exemplu, caracteristicile sexuale secundare pe baza papilelor înotătoarelor anale și a histologiei anale și gonadale) pentru F1, sexul fenotipic pentru F1, caracteristicile sexuale secundare (papilele înotătoarelor anale) pentru valoarea mRNA a *vtg* (sau proteina VTG) pentru F1, evaluarea histopatologică (gonada, ficatul și rinichii) pentru F1 și reproducerea (fecunditate și fertilitate) pentru F0 , F1; (a se vedea tabelele 1 și 2).

— abordarea analizei statistice (analiza regresiei sau analiza varianței) și tratarea datelor (teste statistice și modele utilizate);

— concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;

— concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la $p = 0,05$); CE_x pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (de exemplu 90 % sau 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați ai modelului și erorile standard ale acestora.

— Orice abatere de această metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.

▼M8

60. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) OCDE (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 171), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K și Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T și Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T și Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H și Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H și Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H și Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M și Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M și Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T și Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Publicație disponibilă la adresa: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P și McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE și Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ și Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K și Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K și Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Capitolul C.15 din prezenta anexă, Pește, test de toxicitate pe termen scurt privind stadiul embrionar și de pești tineri.

(22) Capitolul C.37 din prezenta anexă, Analiza de 21 de zile pentru pești: screening cu durată scurtă pentru detectarea activității estrogenice și androgenice și a inhibării aromatazei.

(23) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.

(24) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.

(25) Capitolul C.47 din prezenta anexă, Pești, Testul de toxicitate în stadii de viață timpurii.

(26) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L și Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M și Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 227). Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M și Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S și Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN și Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIțII

Substanță chimică: o substanță sau un amestec.

ELISA: test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

Fecunditate = numărul ouălor;

Fertilitate = numărul ouălor viabile/fecunditate;

Lungimea cozii (LC): se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și capătul radiilor de mijloc ale înotătoarei caudale și este utilizată la peștii la care este dificil de precizat unde se termină coloana vertebrală (www.fishbase.org)

Capacitatea de eclozare = larve/numărul de embrioni încărcați într-un incubator

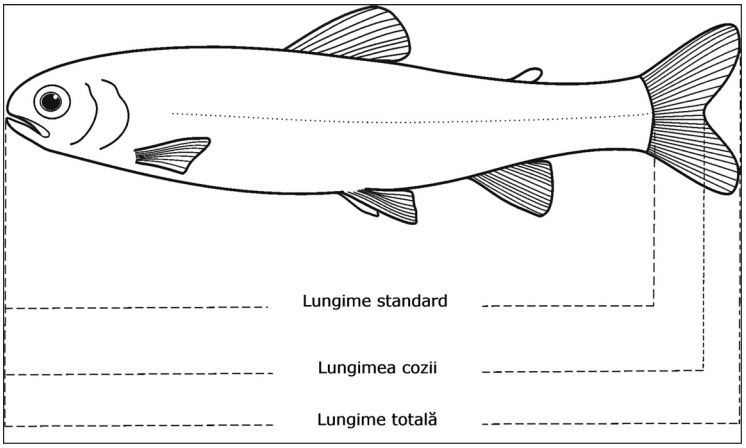
IACUC: Comitetul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor

Lungimea standard (SL) se referă la lungimea unui pește măsurat de la vârful botului până la extremitatea posterioară a ultimei vertebre sau la extremitatea posterioară a liniei laterale a pedunculului. Cu alte cuvinte, această măsurătoare exclude lungimea înotătoarei caudale. (www.fishbase.org)

Lungimea totală (LT) se referă la lungimea cuprinsă între vârful botului și vârful lobului mai lung a înotătoarei caudale, măsurată de regulă cu lobii comprimați de-a lungul liniei laterale. Acesta este o măsurătoare în linie dreaptă, nu una măsurată urmând curbura corpului (www.fishbase.org)

Figura 1

Descrierea diferitelor lungimi folosite



CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50 % dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

Testul în regim dinamic este un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal.

▼**M8**

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Rata de încărcare: greutatea umedă a peștelui per volum de apă.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 5 și 6 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO) este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Densitatea populației: numărul de pești pe unitatea de volum de apă.

Substanță chimică de testat: orice substanță sau amestec testat utilizând prezenta metodă de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

SDF: săptămâni după fertilizare

▼**M8**

Apendicele 2

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Substanță	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

▼**M8**

Apendicele 3

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU MEOGRT

1. Specii recomandate	Medaka japoneză (*Oryzias latipes*)
2. Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3. Temperatura apei	Temperatura nominală de testare este de 25 °C. Temperatura medie pe durata testului în fiecare bazin este de 24-26 °C.
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg și ~150 lumeni/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperioadă	16 h de lumină, 8 h de întuneric
6. Rata de încărcare	F0: 2 adulți/duplicat; F1: inițiată cu maxim 20 de ouă (embrioni) /duplicat, redusă la 12 embrioni /duplicat la eclozare, apoi 2 adulți (pereche de reproducție XX-XY) la 9-10 sdf pentru faza de reproducere
7. Volum minim utilizabil în camera de testare	1,8 l (de exemplu, dimensiunea camerei de testare: 18 x 9 x 15 cm)
8. Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Minim 5 reînnoiri de volum/zi până la maxim 16 reînnoiri de volum/zi (sau un debit de 20 ml/min)
9. Vârsta organismelor de testare la inițiere	F0: > 12 sdf, însă se recomandă să nu se depășească 16 sdf
10. Numărul de organisme per duplicat	F0: 2 pești (pereche mascul și femelă); F1: Maxim 20 pești (ouă)/duplicat (produși din perechi de reproducție F0 și F1).
11. Număr de tratamente	5 tratamente chimice de testare plus martorii (martorul) adecvat (adecvați)
12. Numărul de duplicate per tratament	Minimum 6 duplicate pe tratament pentru o substanță chimică de testat și minim 12 duplicate pentru martor și pentru martorul tratat cu solvent, dacă se utilizează (numărul de duplicate este dublu în faza de reproducere în F1)
13. Numărul de organisme per test	Cel puțin 84 de pești în F0 și 504 în F1. (în cazul în care se utilizează un martor tratat cu solvent, atunci se utilizează 108 pești în F0 și 648 de pești în F1). Unitatea numărată este cea rezultată după eclozarea embrionilor.
14. Regimul de hrănire	Peștii sunt hrăniți cu creveți de saramură, *Artemia* spp., (nauplii de 24 de ore) *ad libitum*, hrana fiind suplimentată de un tip de hrană sub formă de fulgi disponibilă în comerț, dacă este necesar (un exemplu de program de hrănire prin care să se asigure o creștere și o dezvoltare adecvate pentru a sprijini o reproducere sigură se găsește în apendicele 5).

▼**M8**

15. Aerarea	Nu există, cu excepția cazului în care oxigenul dizolvat se apropie de < 60 % din valoarea de saturație în aer
16. Apa de diluție	Apă curată de suprafață, din puțuri sau reconstituită sau apă de la robinet declorizată.
17. Perioadă de expunere	În primul rând, 19 săptămâni (incubație de la F0 la F2)
18. Puncte finale biologice (primare)	Capacitate de eclozare (F1 și F2); rata de supraviețuire [F1, de la eclozare la 4 sdf (sfârșitul etapei larvare/începutul etapei de pești tineri), de la 4 la 9 (sau 10) sdf (de la începutul etapei de pești tineri la etapa de subadulți) și de la 9 la 15 sdf (de la etapa de subadulți la încheierea etapei de adulți)]; creștere (F1, lungime și greutate la 9 și 15 sdf); caracteristici sexuale secundare (F1, papilele înotătoarelor anale la 9 și 15 sdf); vitelogenină (F1, valoarea mRNA a *vtg* sau proteina VTG la 15 sdf); sexul fenotipic (F1, prin histologia gonadelor, la 15 sdf); reproducere (F0 și F1, fecunditate și fertilitatea timp de 21 de zile); timp până la depunere (F1); și histopatologia (F1, gonadă, ficat și rinichi la 15 sdf)
19. Criterii de validitate a testului	Oxigen dizolvat de ≥ 60 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei de 24-26°C pe parcursul testului; reproducerea cu succes a unui procent de ≥ 65 % dintre femelele din soluțiile (soluția) martor; fecunditatea medie zilnică ≥ 20 de ouă la martor(i); capacitatea de eclozare ≥ 80 % (în medie) la martori (la fiecare dintre generațiile F1 și F2); supraviețuirea după eclozare până la 3 sdf ≥ 80 % (în medie) și de la 3 sdf până la încheiere pentru generația ≥ 90 % (în medie) la martori (F1), concentrațiile substanței chimice de testat în soluție ar trebui menținute în mod satisfăcător în intervalul ± 20 % din valorile medii măsurate.

▼M8

Apendicele 4

ORIENTĂRI PRIVIND VALORILE TIPICE ALE MARTORILOR

Ar trebui remarcat faptul că aceste valori ale martorilor se bazează pe un număr limitat de studii de validare și pot face obiectul unor modificări în lumina experienței viitoare.

Creștere

Sunt efectuate măsurători de greutate și de lungime pentru toți peștii eșantionați la 9 (sau 10) și la 15 săptămâni după fertilizare (sdf). Acest protocol va genera valori preconizate de greutate umedă, la 9 sdf, de 85-145 mg la masculi și 95-150 mg la femele. Valorile preconizate de greutate, la 15 sdf, sunt de 250-330 mg la masculi și de 280-350 mg la femele. Deși pot exista abateri semnificative de la aceste intervale pentru fiecare pește, valorile medii ale greutăți care se află în mod semnificativ în afara acestor intervale, în special cele mai scăzute, ar sugera probleme legate de hrănire, controlul temperaturii, calitatea apei, boli sau orice combinație a acestor factori.

Eclozare

Reușita eclozării la martori este, de regulă, de aproximativ 90 %, însă valorile scăzute precum 80 % nu sunt rare. Reușita eclozării sub 75 % poate indica agitarea insuficientă a ouălor în curs de dezvoltare sau atenția necorespunzătoare la manipularea ouălor, cum ar fi lipsa eliminării în timp util a ouălor moarte, ceea ce conduce la o infestare fungică.

Supraviețuire

Ratele de supraviețuire până la 3 sdf de la eclozare și după 3 sdf sunt, de regulă, de 90 % sau mai mult în cazul martorilor, dar ratele de supraviețuire reduse în primele stadii de viață, de 80 % în cazul martorilor, nu sunt alarmante. Ratele de supraviețuire în cazul martorilor care nu depășesc 80 % ar fi motive de îngrijorare și pot indica o curățare insuficientă a acvariilor, ceea ce determină pierderi de pești larvari prin îmbolnăvire sau sufocare din cauza nivelurilor scăzute de oxigen dizolvat. Mortalitatea poate să apară, de asemenea, ca urmare a unei vătămări în timpul curățării bazinului și prin pierderea de pești larvari în sistemul de evacuare al bazinului.

Gena vitelogenină

Deși nivelurile absolute ale genei *vitelogenine* (*vtg*) care sunt exprimate ca și copii/ng din totalul mRNA, pot varia semnificativ între laboratoare din cauza procedurilor sau a aparatelor utilizate, procentul *vtg* ar trebui să fie de aproximativ 200 de ori mai mare la femelele din soluția martor față de masculii din soluția martor. Nu este neobișnuit ca acest procent să fie între 1 000 și 2 000; însă procentele mai mici de 200 sunt suspecte și pot indica probleme legate de contaminarea probelor sau probleme legate de procedura și/sau reactivii utilizați.

Caracteristici sexuale secundare

Pentru masculi, intervalul normal al caracteristicilor sexuale secundare, definit ca fiind numărul total de segmente în radiile papilelor înotătoarelor anale, este de 40-80 de segmente la 9-10 sdf. Până la 15 sdf, intervalul pentru masculii din soluția martor ar trebui să fie în jur de 80-120 și 0 pentru femelele din soluția martor. Din motive neexplicate, în cazuri rare, unii masculi nu dezvoltă papile până la împlinirea a 9 sdf dar, întrucât toți masculii din soluția martor dezvoltă papile până la împlinirea a 15 sdf, acest lucru se întâmplă, cel mai probabil, din cauza dezvoltării întârziate. Prezența papilelor la femelele din soluția martor indică prezența masculilor XX în populație.

▼**M8**

Masculii XX

Incidența normală pe fond a masculilor XX în cultură pare a fi de aproximativ 4 % sau mai puțin la 25 °C, aceasta crescând odată cu creșterea temperaturii. Ar trebui să se ia măsuri pentru a se reduce la minim proporția de masculi XX în populație. Întrucât incidența masculilor XX pare să aibă o componentă genetică și, prin urmare, este ereditară, monitorizarea stocul de cultură și asigurarea că masculii XX nu sunt utilizați pentru a propaga stocul de cultură reprezintă un mijloc eficient de a reduce incidența masculilor XX în populație.

Activitatea de depunere a ouălor

Activitatea de depunere a ouălor în duplicatele martor ar trebui monitorizată zilnic înainte de evaluarea fecundității. Perechile din soluția martor pot fi evaluate din punct de vedere calitativ vizual pentru a obține dovezi privind activitatea de depunere a icrelor. Până la împlinirea a 12-14 sdf, majoritatea perechilor din soluția martor ar trebui să depună icre. Numărul redus de perechi de depunere a icrelor până la împlinirea acestei perioade indică existența unor posibile probleme legate de sănătatea, maturitatea sau bunăstarea peștilor.

Fecunditate

Peștii metaka sănătoși și bine hrăniți depun icre zilnic până la împlinirea perioadei de 12-14 sdf, producând între 15 și 50 de icre pe zi. În ceea ce privește producția de icre, 16 din cele 24 perechi de reproducere din soluția martor recomandate (> 65 %) ar trebui să producă mai mult de 20 de icre per pereche pe zi, putând ajunge până la aproximativ 40 de icre pe zi. O cantitate mai mică decât aceasta poate indica perechi de reproducție imature, malnutrite sau nesănătoase.

Fertilitate

Procentul de icre fertile pentru perechile de reproducere din soluția martor este, de regulă, situat în intervalul de 90 %, fiind frecvente valorile medii și cele superioare până la 90 %. Ratele de fertilitate mai mici de 80 % pentru icrele din soluția martor sunt suspecte și pot indica fie indivizi nesănătoși, fie condiții de cultură mai puțin ideale.

▼**M8**

Apendicele 5

UN EXEMPLU DE PROGRAM DE HRĂNIRE

Un exemplu de program de hrănire pentru a asigura o creștere și dezvoltare adecvată în vederea susținerii unei reproduceri fiabile este prezentat în tabelul 1. Abaterile de la acest program de hrănire pot fi acceptabile, dar se recomandă ca acestea să fie testate pentru a se verifica dacă se respectă condiția de creștere și reproducere acceptabilă. Pentru a respecta programul de hrănire sugerat, înainte de începerea testului trebuie să se determine greutatea uscată a creveților în saramură pe volum de dejecții ale creveților respectivi. Acest lucru se poate realiza prin cântărirea unui volum definit de dejecții de creveți în saramură care au fost uscate timp de 24 de ore la 60 °C pe un recipient cântărit în prealabil. Pentru a ține seama de greutatea sărurilor din dejecții, un volum identic de aceeași soluție salină utilizată în dejecții ar trebui să fie, de asemenea, uscat, cântărit și scăzut din greutatea dejecțiilor în saramură uscate. În mod alternativ, crevеții în saramură pot fi filtrați și clătiți cu apă distilată înainte de uscare, eliminând astfel necesitatea de a măsura greutatea unui „corp de sare”. Aceste informații sunt utilizate pentru a transforma informațiile din tabel din greutate uscată de creveți în saramură în volum de dejecții ale crevеților în saramură utilizate individual ca hrană pentru pești. În plus, se recomandă ca părțile alicote din dejecțiile crevеților în saramură să fie cântărite săptămânal pentru a se verifica greutatea uscată corectă a crevеților în saramură utilizați ca hrană.

Tabelul 1

Exemplu de program de hrănire

Timp (după eclozare)	Creveți în saramură (greutate uscată în mg/pește/zi)
Ziua 1	0,5
Ziua 2	0,5
Ziua 3	0,6
Ziua 4	0,7
Ziua 5	0,8
Ziua 6	1,0
Ziua 7	1,3
Ziua 8	1,7
Ziua 9	2,2
Ziua 10	2,8
Ziua 11	3,5
Ziua 12	4,2
Ziua 13	4,5
Ziua 14	4,8
Ziua 15	5,2
Zilele 16-21	5,6

▼**M8**

Timp (după eclozare)	Creveți în saramură (greutate uscată în mg/pește/zi)
Săptămâna 4	7,7
Săptămâna 5	9,0
Săptămâna 6	11,0
Săptămâna 7	13,5
Săptămâna 8-sacrificare	22,5

▼**M8**

Apendicele 6

Exemple de Cameră de Incubație a Icrelor

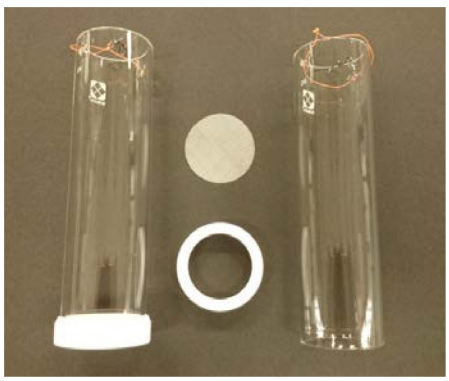
Exemplul A





Acest incubator este format dintr-o eprubetă de centrifugă din sticlă secționată transversal, care este conectată printr-un manşon din oțel inoxidabil şi fixată cu capacul cu filet al centrifugei. O eprubetă mică din sticlă sau din oțel inoxidabil este proiectată prin capac şi este poziționată în apropierea părții inferioare rotunjite, formând uşor bule de aer pentru a suspenda icrele şi pentru a reduce transmiterea între icre a infecțiilor saprofite fungice, facilitând totodată schimbul de substanțe chimice între incubator şi rezervorul de păstrare.

Exemplul B



▼**M8**



Acest incubator este format dintr-un corp cilindric din sticlă (cu diametru de 5 cm și înălțime de 10 cm) și dintr-o plasă metalică din oțel inoxidabil (0,25 φ și ochiul de plasă de 32) care este prinsă de partea inferioară a corpului cu un inel PTFE. Incubatoarele sunt suspendate de la bara de ridicare la bazine și se agită vertical (o amplitudine de aproximativ 5 cm) într-un ciclu corespunzător (aproximativ o dată la 4 secunde) pentru icrele de medaka.

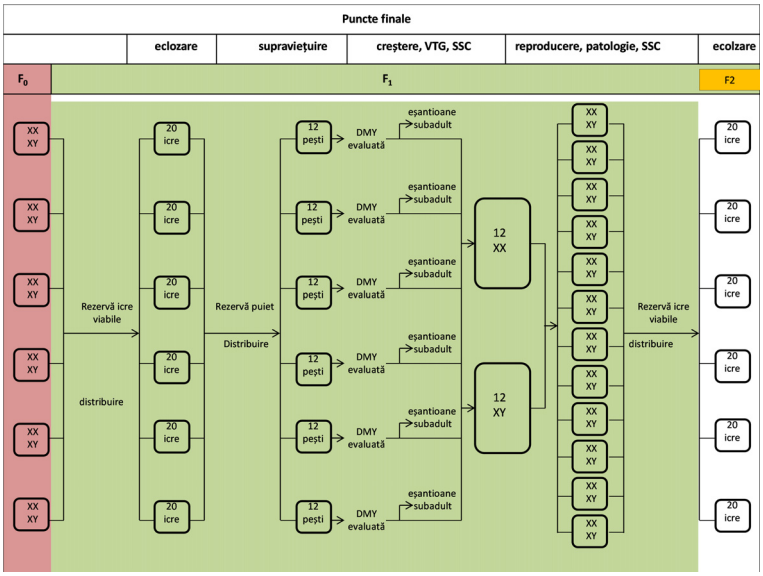
▼M8

Apendicele 7

SCHEMA GRUPĂRII ȘI POPULĂRII DUPLICATELOR PE PARCURSUL METODEI DE TESTARE MEOGRT

Figura 1

Gruparea și repopularea duplicatelor pe parcursul metodei MEOGRT. Cifra reprezintă un tratament sau 1/2 dintr-o soluție martor. Datorită grupării, identitatea duplicatelor nu este continuă pe parcursul testului. Este de precizat faptul că termenul „icre” se referă la icre viabile, fertilizate (echivalente cu embrioni).



Tratamente și duplicare.

Metoda de testare recomandă cinci tratamente cu substanțe chimice de testat utilizând material tehnic de calitate și un martor negativ. Numărul duplicatelor per tratament nu rămâne constant pe parcursul testului MEOGRT, iar numărul duplicatelor în tratamentul cu soluție martor este dublu față de orice tratament cu o substanță chimică de testat. La generația F0, fiecare tratament cu substanțe chimice de testat are șase duplicate, iar tratamentul cu martor negativ are 12 duplicate. Recomandăm în mod insistent să nu se folosească solvenți, iar în caz contrar, în raportul MEOGRT ar trebui să se prezinte o justificare atât pentru utilizarea unui solvent, cât și pentru alegerea solventului. De asemenea, dacă se utilizează un solvent, sunt necesare două tipuri de martori: a) un martor tratat cu solvent și b) un martor negativ. Aceste două grupuri de martori ar trebui să cuprindă fiecare o rezervă completă de duplicate în toate punctele perioadei de desfășurare a testului MEOGRT. Pe parcursul dezvoltării organismelor supuse testării din generația F1 (și F2, până la eclozare), această structură de duplicate rămâne aceeași. Însă, în stadiul de adult, atunci când se constituie perechile de reproducere în F1, numărul perechilor duplicat de reproducere pentru fiecare tratament se dublează în mod optim; prin urmare, există maxim 12 perechi de duplicate în cadrul fiecărui tratament cu substanțe chimice de testat și 24 de perechi de duplicate în grupul de martori (și alte 24 de perechi de duplicate în martorul tratat cu solvent, dacă este necesar). Momentul ecloziunii la embrionii depuși de perechile din F1 se determină pe aceeași structură de duplicate ca și în cazul embrionilor depuși de perechile din F0, ceea ce înseamnă inițial șase duplicate pentru fiecare tratament cu substanță chimică și 12 duplicate în grupul (grupurile) cu martori.

▼**M8**

Apendicele 8

NUMĂRAREA PAPILELOR ÎNOTĂTOAREI ANALE

Materiale și reactivi principali

— Microscop de disecție (cu cameră video atașată opțional)

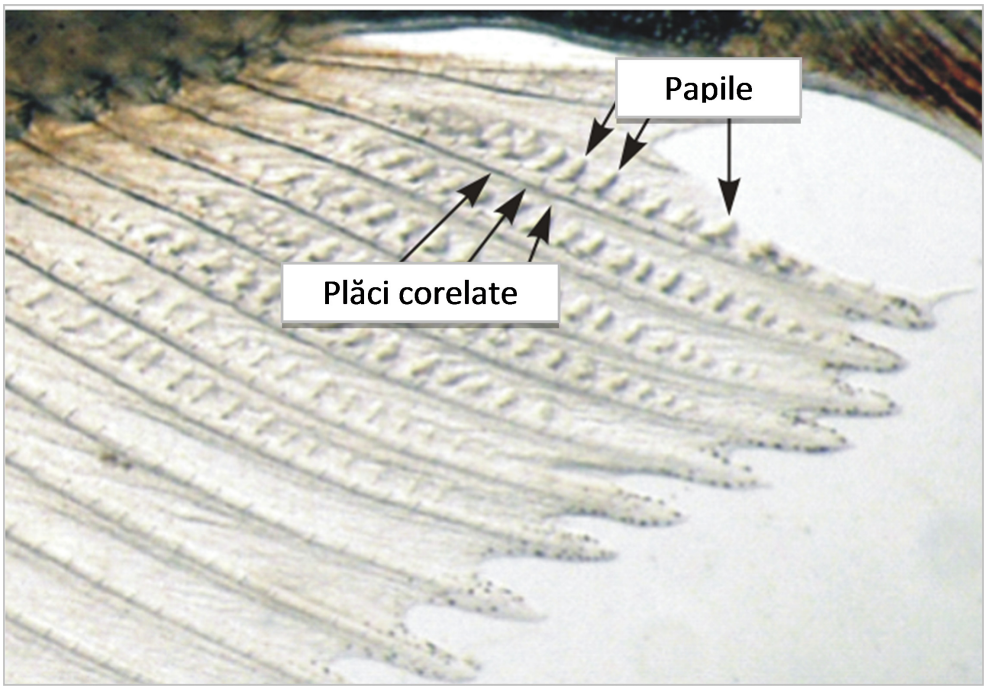
— Fixator [de exemplu, Davidson's (Bouin's nu este recomandat)], dacă numărătoarea nu este efectuată din imagine

Proceduri

După necropsie, înotătoarea anală ar trebui să fie procesată imagistic pentru a permite numărarea convenabilă a papilele înotătoarelor anale. Chiar dacă procesarea imagistică este metoda recomandată, înotătoarea anală poate fi fixată cu fixator Davidson's sau cu un alt fixator adecvat timp de aproximativ 1 minut. Este important ca înotătoarea anală să fie menținută la nivel plan în timpul fixării pentru a permite numărarea mai ușoară a papilelor. Carcasa cu înotătoarea anală poate fi păstrată în fixatorul Davidson's sau în alt fixator adecvat până la analiză. Se numără plăcile comune (a se vedea **figura 1**) cu papile care ies în afară din marginea posterioară a plăcii comune.

Figura 1

(Papila înotătoarei anale)



▼M8

Apendicele 9

CALENDARUL DETALIAT AL MEOGRT

Săptămânile de testare 1-3 (F0)

Peștii reproducători din generația F0, care au îndeplinit criteriile de selecție (a se vedea punctele 16-20) sunt expuși timp de trei săptămâni pentru a permite gameților și țesuturilor gonadale în curs de dezvoltare să fie expuse la substanța chimică de testat. Fiecare bazin duplicat găzduiește o singură pereche de pești de reproducere (pereche de reproducere cu femelă XX-mascul XY). Ouăle depuse sunt colectate, numărate și evaluate pentru fertilitate timp de 21 de zile consecutiv, începând cu ziua de testare 1.

Săptămâna de testare 4 (F0 și F1)

Este preferabil ca icrele (embrionii) fecundate (fecundați) și viabile (viabili) să fie colectate într-o singură zi; însă, în cazul în care nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Mortalitatea icrelor fertilizate (embrionilor) este verificată și înregistrată zilnic. Icrele moarte sunt scoase din incubatoare (moartea la icrele fertilizate poate fi reprezentată, în special în stadiile incipiente, printr-o pierdere semnificativă a translucidității și schimbarea colorației din cauza coagulării și/sau a precipitării proteinelor, rezultând un aspect alb-opac; OCDE 2010).

Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator, se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator. În plus, în generația F0 ar putea fi adăugate mai multe perechi de reproducere pentru fiecare tratament și martori pentru a produce mai multe icre astfel încât să se ajungă la numărul recomandat de 20 de icre per duplicat.

În ziua de testare 24, perechile de reproducere din F0 sunt eutanasiate și se înregistrează greutatea și lungimea. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F0 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F1.

Săptămânile de testare 5-6 (F1)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitarea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. Pe măsură ce embrionii eclozează în fiecare zi, larvele sunt grupate prin intermediul tratamentului și distribuite în mod sistematic în fiecare bazin cu duplicate larvare în cadrul unui anumit tratament, care conține maxim 12 larve. Acest lucru se realizează prin selectarea aleatorie a larvelor și plasarea unei singure larve în duplicate succesive, în urma unei extrageri nediscriminatorii, trecând în ordine prin duplicatele de tratament specifice până când toate duplicatele din cadrul tratamentului au 12 icre. În cazul în care nu există suficiente larve pentru a umple toate duplicatele, se asigură faptul că există cât mai multe duplicate cu 12 larve pentru a începe faza F1.

Icrele fertilizate care nu au eclozat până în perioada echivalentă cu dublul zilei mediane a incubației din martor se consideră neviabile și sunt eliminate. Se înregistrează numărul larvelor și se calculează reușita eclozării (capacitatea de eclozare) la fiecare duplicat.

▼M8

Săptămânile de testare 7-11 (F1)

Se verifică și se înregistrează zilnic supraviețuirea peștilor larvari în toate duplicatele. În ziua de testare 43, se înregistrează numărul de pești supraviețuitori din fiecare duplicat, precum și numărul inițial de larve introduse în duplicat (nominal douăsprezece). Acest lucru permite calcularea ratei de supraviețuire de la eclozare la etapa de subadult.

Săptămâna de testare 12 (F1)

În ziua de testare 78-85, este prelevată o probă mică din înotătoarea caudală a fiecărui pește pentru a determina sexul genotipic al individului (și anume, tăierea înotătoarelor) pentru toți peștii. Aceste informații sunt utilizate pentru a stabili perechi de reproducere.

În termen de trei zile de la determinarea sexului genotipic al fiecărui pește, se stabilesc în mod aleatoriu 12 perechi de reproducere pentru fiecare tratament și 24 de perechi pentru fiecare martor. Se selectează în mod aleatoriu și apoi se grupează după sex doi pești XX și XY din fiecare duplicat, iar apoi dintre aceștia se selectează în mod aleatoriu pești pentru a stabili o pereche de reproducere (de exemplu, perechea XX-XY). Se stabilesc minim 12 replici per tratament chimic și minim 24 de duplicate pentru martor cu o pereche de reproducere pentru fiecare duplicat. În cazul în care un duplicat nu are doi pești XX sau doi pești XY disponibili pentru grupare, atunci ar trebui să se obțină pești cu genotipul de gen adecvat din alte duplicate în cadrul tratamentului.

Restul de pești (maximum 8 pești per duplicat) sunt eutanasiați și supuși prelevării de probe pentru diferite puncte finale ale subadulților. Datele *dmy* (XX sau XY) pentru toate probele de subadulți sunt reținute pentru a se asigura că toate datele privind punctele finale pot fi asociate cu sexul genetic al fiecărui pește.

Săptămânile de testare 13-14 (F1)

Expunerea continuă pe măsură ce perechile de reproducere subadulte devin adulți. În ziua de testare 98 (și anume, ziua dinaintea începerii colectării icrelor), icrele sunt eliminate atât din acvarii, cât și din femele.

Săptămânile de testare 15-17 (F1)

Icrele eclozate sunt colectate zilnic timp de 21 de zile consecutiv în fiecare duplicat și evaluate pentru fecunditate și fertilitate.

Săptămâna de testare 18 (repetarea săptămânii de testare 4) (F1 și F2)

În ziua de testare 120, se colectează icre din fiecare bazin duplicat dimineața. Icrele colectate sunt evaluate, iar icrele fertilizate (cu filamentele eliminate) de la fiecare pereche de reproducere sunt grupate pe tratamente și distribuite sistematic în camerele de incubare a icrelor, fiind introduse 20 de icre fertilizate în fiecare incubator. Incubatoarele pot fi introduse în „bazine incubatoare” separate constituite pentru fiecare tratament sau în bazinul duplicat care, în momentul eclozării, va conține larvele eclozate. Este preferabil ca embrionii să fie colectați într-o singură zi; însă, dacă nu există suficienți embrioni, embrionii pot fi colectați pe parcursul a două zile. Dacă au fost colectați timp de două zile, toți embrionii din cadrul tratamentelor care au fost colectați în prima zi sunt grupați cu cei colectați în a doua zi. Apoi toți embrionii grupați pentru fiecare tratament sunt distribuiți în mod aleatoriu în fiecare dintre incubatoarele duplicate la 20 de embrioni per incubator. Notă: În cazul în care un singur tratament necesită o a doua zi de colectare, toate tratamentele (inclusiv martorii) trebuie să urmeze această procedură. În cazul în care, după cea de a doua zi de colectare, există un număr insuficient de embrioni în cadrul unui tratament pentru a încărca 20 de embrioni per incubator, se reduce numărul de embrioni încărcați în cadrul respectivului tratamentului specific la 15 embrioni per incubator. Dacă nu există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator,

▼M8

se reduce numărul de incubatoare duplicate până când există suficienți embrioni pentru a încărca 15 dintre aceștia într-un incubator.

În ziua de testare 121 (sau ziua de testare 122, pentru a se asigura un bun început pentru F2), perechile de reproducere F1 sunt eutanasiate și analizate pentru punctele finale la adulți. Dacă este necesar, perechile de reproducere din F1 pot fi păstrate pentru o perioadă suplimentară de 1-2 zile pentru reînceperea F2.

Săptămânile de testare 19-20 (F2)

Cu una până la două zile înainte de data anticipată a începerii eclozării, se oprește sau se reduce agitarea icrelor aflate în faza de incubație pentru a accelera eclozarea. În cazul în care testul se încheie prin finalizarea procesului de eclozare la generația F2, larvele sunt numărate și eliminate în fiecare zi. Embrionii care nu au eclozat după un timp de incubație prelungit, definit ca fiind de perioada echivalentă dublului zilei medii de eclozare în martor, sunt considerate neviabile).

▼**M8**

Apendicele 10

ANALIZA STATISTICĂ

Tipurile de date biologice generate în cadrul MEOGRT nu sunt unice și, cu excepția datelor privind patologia, au fost elaborate multe metodologii statistice adecvate pentru analiza corespunzătoare a datelor similare în funcție de caracteristicile datelor, inclusiv normalitatea, omogenitatea variației, dacă proiectul studiului se pretează la testarea ipotezei sau la analiza regresiei, la testele parametrice comparativ cu cele neparametrice etc. Ca și principiu general, analizele statistice sugerate respectă recomandările OCDE pentru datele privind ecotoxicitatea (OCDE 2006), iar în figura 2 se poate observa o diagramă decizională pentru analiza datelor MEOGRT.

Se presupune că, de cele mai multe ori, seturile de date vor afișa răspunsuri monotone. În plus, ar trebui să fie luată în considerare problema utilizării unui test statistic unidirecțional, față de un test statistic bidirecțional. Cu excepția cazului în care există un raționament biologic care ar indica faptul că testul unidirecțional este inadecvat, se recomandă utilizarea testelor unidirecționale. Chiar dacă următoarea secțiune recomandă anumite teste statistice, dacă sunt elaborate metode statistice mai adecvate și/sau mai puternice pentru a fi aplicate în cazul datelor specifice generate în MEOGRT, aceste teste statistice ar fi utilizate pentru a valorifica aceste avantaje.

Datele MEOGRT ar trebui analizate separat pentru fiecare sex genotipic. Există două strategii de analiză a datelor de la peștii cu sex inversat (fie masculi XX, fie femele XY). 1) Se cenzurează toate datele de la peștii cu sexul inversat pe parcursul întregului test, cu excepția prevalenței sexului inversat din fiecare duplicat. 2) Datele de la toți peștii cu sexul inversat sunt lăsate în setul de date și analizate pe baza genotipului.

Date privind histopatologia

Datele privind histopatologia sunt raportate ca punctaje de severitate care sunt evaluate cu ajutorul unei proceduri statistice nou dezvoltate, și anume Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al*., 2014). Ajustarea *Rao-Scott* reține informații privind replicarea testului; procedura *by Slices* integrează așteptarea biologică conform căreia punctajele de severitate tind să crească odată cu creșterea concentrațiilor de tratament. Pentru fiecare diagnostic, datele de ieșire RSCABS specifică tratamentele cu o prevalență mai mare a patologiei decât martorii și gradul de severitate aferent.

Date privind fecunditatea

Analizele pentru datele privind fecunditatea constau într-un test de tip „step-down” Jonckheere-Terpstra sau Williams pentru determinarea efectelor tratamentului, cu condiția ca datele să fie consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă. Cu un test de tip „step-down”, toate comparațiile se realizează la nivelul de semnificație de 0,05 și fără ajustare pentru numărul comparațiilor realizate. Datele sunt prevăzute a fi consecvente cu o relație concentrație-răspuns monotonă, dar acest lucru poate fi verificat fie prin inspecția vizuală a datelor, fie prin construirea de contraste liniare și pătratice ale mijloacelor de tratare, după o transformare a datelor prin clasificare. Cu excepția cazului în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, se efectuează testul tendinței. În caz contrar, se utilizează testul Dunnett pentru determinarea efectelor tratării dacă datele sunt distribuite în mod normal cu variații omogene. În cazul în care aceste cerințe nu sunt îndeplinite, se utilizează testul Dunn cu o ajustare Bonferonni-Holm. Toate testele indicate sunt efectuate independent de orice test global F- sau Kruskal-Wallis. Mai multe detalii sunt furnizate în OCDE 2006.

▼M8

Pot fi utilizate metode alternative, cum ar fi un model liniar generalizat cu erori Poisson pentru numărarea icrelor (fără transformare), dacă acestea sunt justificate din punct de vedere statistic (Cameron și Trividi, 2013). Se recomandă un aviz statistic dacă se utilizează o metodă alternativă.

Numărarea zilnică a icrelor în cadrul unei generații unice

Modelul ANOVA este dat de Y = timp*timp + tratament + *tratament + timp*tratament + *timp*tratament, cu efecte aleatorii ale duplicatului (generare*tratament) și timp*duplicat (tratament), permițând existența unor componente inegale ale variației pentru ambele tipuri de la o generație la alta. Aici, timpul se referă la frecvența numărării ouălor (de exemplu, zi sau săptămână). Aceasta este o analiză a măsurilor repetate, stabilindu-se corelații între observații cu privire la aceleași duplicate, care reprezintă natura măsurilor repetate a datelor.

Efectele principale ale tratamentului sunt testate folosind testul Dunnett (sau Dunnett-Hsu), care se ajustează în funcție de numărul de comparații. Se impun ajustări pentru efectul principal al generației sau timpului, deoarece, cu acești doi factori, nu există niciun nivel de „control” și fiecare pereche de niveluri reprezintă o comparație a interesului posibil. Pentru aceste două efecte principale, dacă testul F pentru efectul principal este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci se pot testa comparații pe perechi între niveluri ale factorului respectiv la nivelul de 0,05 fără ajustări suplimentare.

Modelul include interacțiuni cu două și trei factori, astfel încât, de exemplu, un efect principal, de pildă pentru timp, să nu poată fi semnificativ chiar dacă timpul are un impact semnificativ asupra rezultatelor. Astfel, în cazul în care o interacțiune cu doi sau trei factori care implică timp este semnificativă la nivelul de 0,05, atunci se pot accepta comparațiile nivelurilor de timp la nivelul de semnificație de 0,05, fără o ajustare ulterioară.

Următoarele sunt testele F pentru semnificația tratamentului în intervalul de timp, așa-numitele fragmente din tabelul ANOVA. În cazul în care, fragmentul pentru tratament din F1 și timpul 12 este semnificativ la nivelul de 0,05, atunci comparațiile pe perechi pentru tratament din cadrul F1 și timpul 12 pot fi acceptate fără ajustări ulterioare. Afirmații similare sunt valabile în cazul testelor pentru timp în F1 și tratament, precum și pentru generație într-un interval de timp și tratament.

În cele din urmă, pentru comparații care nu se încadrează în niciuna dintre categoriile de mai sus, comparațiile ar trebui realizate folosind ajustarea Bonferroni-Holm la valorile p. Informații suplimentare privind analizele unor astfel de modele se găsesc în Hocking (1985) și în Hochberg și Tamhane (1987).

În mod alternativ, datele brute sunt înregistrate și prezentate în raportul privind studiul ca și fecunditate (număr de icre) per duplicat pentru fiecare zi. Ar trebui să se calculeze media duplicată a datelor brute, după care să se aplice transformarea la rădăcină pătrată. Ar trebui să se calculeze ANOVA unidirecțională pe mediile duplicate transformate, apoi contrastele. De asemenea, poate fi util să se inspecteze vizual datele despre fecunditate pentru fiecare tratament și/sau duplicat cu ajutorul unei diagrame cu puncte care afișează date în timp. Acest lucru va permite o evaluare informală a efectelor potențiale în timp.

Toate celelalte date biologice

Analizele statistice se bazează pe ipoteza subiacentă că, printr-o selecție corectă a dozei, datele vor fi monotonice. Astfel, se presupune că datele sunt monotonice și sunt evaluate în mod formal pentru monotonicitate prin utilizarea unor contraste liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotonice, se recomandă un test Jonckheere-Terpstra asupra tendinței mediilor duplicate (astfel cum a fost recomandat în OCDE 2006). În cazul în care contrastul pătratic este semnificativ și contrastul liniar nu este semnificativ, datele sunt considerate a fi non-monotonice.

▼**M8**

În cazul în care datele sunt non-monotonice, în special din cauza răspunsului redus al celui mai puternic sau al primelor două cele mai puternice tratamente, ar trebui să se aibă în vedere cenzurarea setului de date astfel încât analiza să se facă fără aceste tratamente. Această decizie va trebui luată pe baza raționamentului profesional și a tuturor datelor disponibile, în special a celor care indică toxicitate evidentă la respectivele niveluri de tratament.

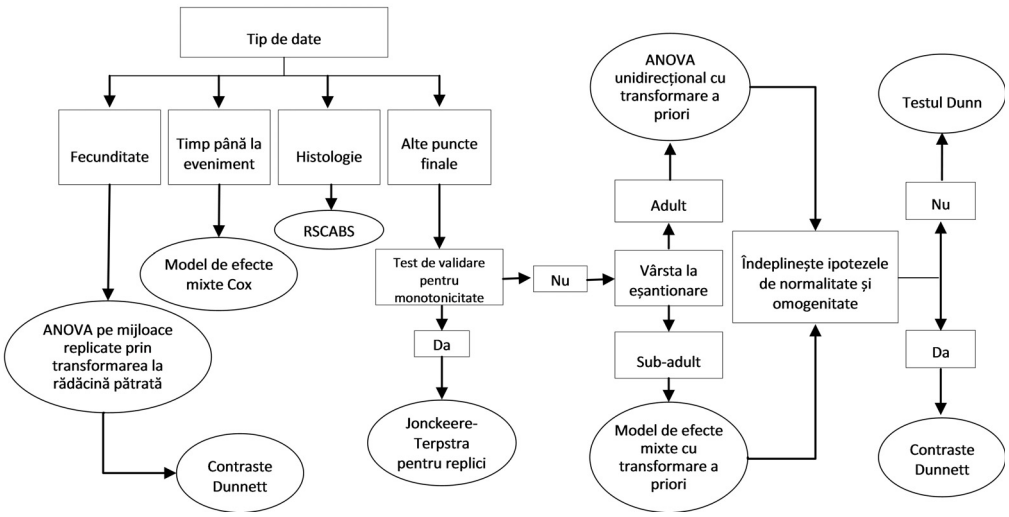
În cazul greutății și al lungimii, nu se recomandă transformări, deși acestea ar putea fi uneori necesare. Însă se recomandă o transformare la nivelul log în cazul datelor privind vitelogenina; pentru datele SSC se recomandă o transformare la nivelul rădăcinii pătrate (papila înotătoarei anale); se recomandă o transformare a valorii arcsin-rădăcină pătrată pentru datele privind proporția eclozării, procentul de supraviețuire, raportul de gen și procentul icrelor fertile. Timpul pentru eclozare și timpul pentru prima depunere ar trebui să fie considerați drept interval până la datele evenimentelor, iar embrionii individuali neeclozați în perioada stabilită sau duplicatele care nu eclozează niciodată sunt tratate drept date cenzurate de drept. Timpul până la eclozare ar trebui să fie calculat din ziua mediană a eclozării la fiecare duplicat. Aceste puncte finale ar trebui să fie analizate cu ajutorul unui model de pericol proporțional Cox cu efecte mixte.

Datele biologice provenite de la probele de adulți prezintă o singură măsurătoare per duplicat, și anume, există un pește XX și un pește XY per acvariu duplicat. Prin urmare, se recomandă efectuarea unui test ANOVA unidirecțional pe mediile duplicate. În cazul în care sunt îndeplinite ipotezele ANOVA (normalitatea și omogenitatea variației, astfel cum au fost evaluate pe valorile reziduale ale ANOVA prin testul Shapiro-Wilks și, respectiv, Levene), ar trebui să se utilizeze contrastele Dunnett pentru determinarea tratamentelor diferite de martor. Pe de altă parte, dacă ipotezele ANOVA nu sunt îndeplinite, atunci ar trebui să se efectueze un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor. Se recomandă o procedură similară pentru datele care sunt prezentate sub formă de procente (fertilitate, eclozare și supraviețuire).

Datele biologice obținute din probele subadulte prezintă între 1 și 8 măsurători per duplicat, și anume, pot exista numere variabile de indivizi care contribuie la media duplicatului pentru fiecare sex genotipic. Prin urmare, se recomandă utilizarea unui model ANOVA cu efecte mixte și apoi a contrastelor Dunnett în cazul în care au fost adeverite ipotezele de normalitate și de omogenitate a variației (pe valorile reziduale ale efectelor mixte ANOVA). Dacă acestea nu s-au adeverit, ar trebui să fie efectuat un test Dunn pentru a stabili tratamentele care au fost diferite de martor.

Figura 2

Diagramă pentru procedurile statistice recomandate pentru analiza datelor MEOGRT.



▼**M8**

Referințe bibliografice

(1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC și Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y și Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. TESTUL PRIVIND CREȘTEREA ȘI DEZVOLTAREA LARVELOR DE AMFIBIENI (LAGDA)

INTRODUCERE

1. Această metodă de testare este echivalentă cu Orientarea OCDE privind testarea nr. 241 (2015). Necesitatea de a dezvolta și de a valida un test care poate să identifice și să caracterizeze consecințele adverse ale expunerii la substanțe chimice toxice la amfibieni apare ca urmare a preocupărilor privind faptul că nivelurile substanțelor chimice din mediu pot cauza efecte adverse atât la oameni, cât și la animale. Orientarea OCDE privind testarea din Testul cu privire la creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni (LAGDA) descrie un test de toxicitate la o specie de amfibieni, care analizează creșterea și dezvoltarea, de la fertilizare la începutul perioadei juvenile. Este un test (de regulă, 16 săptămâni) care evaluează dezvoltarea timpurie, metamorfoza, supraviețuirea, creșterea și maturizarea parțială a sistemului de reproducere. Aceasta permite, de asemenea, măsurarea unei serii de alte puncte finale, care permite evaluarea prin diagnosticare a substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin (EDC) sau a altor tipuri de substanțe toxice pentru dezvoltare și reproducere. Metoda descrisă în această metodă de testare constituie rezultatul activității de validare cu privire la broasca africană cu gheare (*Xenopus laevis*), care a fost desfășurată de Agenția SUA pentru protecția mediului (U.S. EPA), și al activității de sprijin desfășurate în Japonia (1). Deși alte specii de amfibieni pot fi adaptate la un protocol de testare pentru creștere și dezvoltare, capacitatea de a determina sexul genetic constituind o componentă importantă, metodele specifice și punctele finale de observație detaliate în prezenta metodă de testare sunt aplicabile numai în cazul *Xenopus laevis*.

2. LAGDA servește drept test de nivel superior asupra unui amfibian pentru colectarea de informații mai cuprinzătoare despre concentrație-răspuns cu privire la efectele adverse adecvate pentru a fi utilizate în identificarea și caracterizarea pericolelor, precum și în evaluarea riscurilor ecologice. Testul se încadrează la nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine, în cazul în care testele *in vivo* furnizează, de asemenea, date privind efectele adverse asupra punctelor finale relevante pentru sistemul endocrin (2). Modelul experimental general implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF) (3) la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat (în general, stabilite cel puțin la intervale demi-logaritmice) și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF [≤ 45 după fertilizare; de regulă, în jurul a 45 de zile (zdf)]. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru martor. Punctele finale evaluate în timpul expunerii (la proba secundară intermediară și la proba finală la încheierea testului) includ respectivii indicatori ai toxicității generalizate: mortalitate, comportament anormal și determinări de creștere (lungime și greutate), precum și puncte finale concepute pentru caracterizarea unor moduri de acțiune specifice ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. Metoda acordă atenție, în primul rând, efectelor potențiale relevante asupra populației (și anume, efectele adverse asupra supraviețuirii, dezvoltării, creșterii și dezvoltării reproductive) pentru calcularea unei concentrații la care nu se observă niciun efect (NOEC) sau a unei concentrații efective care provoacă o modificare × % (CEx) a punctului final măsurat. Deși ar trebui remarcat faptul că abordările CEx sunt rareori adecvate pentru astfel de studii ample, unde creșterea numărului de concentrații de testare pentru a permite determinarea CEx dorită ar putea să nu fie practică. De asemenea, ar trebui remarcat faptul că metoda nu acoperă faza de reproducere în sine. Definițiile utilizate în cadrul acestei metode de testare sunt prezentate în apendicele 1.

CONSIDERAȚII PRELIMINARE ȘI LIMITĂRI

3. Din cauza numărului limitat de substanțe chimice testate și al laboratoarelor implicate în procesul de validare a acestui test destul de complex, în special reproductibilitatea între laboratoare nu este documentată cu date experimentale până la această dată, se prevede că, atunci când un număr suficient de studii sunt disponibile pentru a confirma impactul acestui nou

▼M8

model de studiu, orientarea 241 a OCDE privind testarea va fi analizată și, dacă este necesar, va fi revizuită în contextul experienței dobândite. LAGDA este un test important pentru a aborda potențiali factori care contribuie la declinul populației de amfibieni prin evaluarea efectelor expunerii la substanțele chimice în etapa larvară sensibilă, în care efectele asupra supraviețuirii și a dezvoltării, inclusiv a dezvoltării normale a organelor de reproducere, pot afecta negativ populațiile.

4. Testul este conceput pentru a detecta (un) efect(e) apical(e) ca urmare a mecanismelor endocrine și neendocrine și include puncte finale de diagnosticare care sunt parțial specifice principalelor modalități endocrine. Ar trebui remarcat faptul că până la elaborarea LAGDA nu a existat un test validat care să servească acestei funcții pentru amfibieni.

5. Înainte de începerea testului, este important să existe informații cu privire la proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat, în special pentru a permite adoptarea de soluții chimice stabile. De asemenea, este necesar să existe o metodă analitică suficient de sensibilă pentru verificarea concentrațiilor substanțelor chimice de testat. Pe o durată de aproximativ 16 săptămâni, testul necesită un număr total de 480 de animale, și anume embrioni *X. laevis* (sau 640 de embrioni, în cazul în care se utilizează un martor solvent), pentru a asigura o putere suficientă a testului în vederea evaluării punctelor finale relevante precum creșterea, dezvoltarea și maturizarea sistemului de reproducere.

6. Înainte de utilizarea metodei de testare pentru testarea unui amestec în scopul reglementării, trebuie luat în considerare dacă aceasta va oferi rezultate acceptabile pentru procesul de reglementare prevăzut. În plus, această testare nu evaluează fecunditatea în mod direct, astfel încât aceasta nu poate fi aplicabilă pentru a fi utilizată într-un stadiu mai avansat decât nivelul 4 din Cadrul conceptual al OCDE pentru testarea și evaluarea substanțelor chimice care perturbă procesele endocrine.

BAZA ȘTIINȚIFICĂ PENTRU METODA DE TESTARE

7. O mare parte din înțelegerea noastră actuală privind biologia amfibienilor a fost dobândită utilizând specia model de laborator *X. laevis*. Această specie poate fi cultivată în mod curent în laborator, ovulația poate fi indusă prin utilizarea gonadotropinei corionice umane (hCG), iar stocurile de animale sunt imediat disponibile la crescătorii de animale din comerț.

8. La fel ca la toate vertebratele, reproducerea la amfibieni este sub controlul axei gonadale pituitare hipotalamice (HPG) (4). Estrogenii și androgenii sunt mediatori ai acestui sistem endocrin, ghidând dezvoltarea și fiziologia țesuturilor dimorfice sexual. Există trei faze distincte în ciclul de viață al amfibienilor, când această axă este deosebit de activă: (1) o diferențiere gonadală în timpul dezvoltării larvelor, (2) dezvoltarea caracteristicilor sexuale secundare și maturizarea gonadală în faza juvenilă și (3) reproducerea funcțională a adulților. Fiecare dintre aceste trei ferestre de dezvoltare este susceptibilă de perturbare endocrină din cauza anumitor substanțe chimice precum estrogenii și androgenii, conducând în cele din urmă la o pierdere a capacității de reproducere a organismelor.

9. Gonadele încep să se dezvolte în etapa 43 din NF, atunci când se dezvoltă pentru prima dată creasta gonadală bipotențială. Diferențierea gonadelor începe în etapa 52 din NF, atunci când celulele germinale primare fie migrează spre țesutul tisular medular (masculi), fie rămân în regiunea

▼M8

corticală (femele) a gonadelor aflate în dezvoltare (3). Acest proces de diferențiere sexuală a gonadelor a fost raportată prima dată ca fiind susceptibil de a fi modificat chimic la *Xenopus* în anii 1950 (5) (6). Expunerea mormolocilor la estradiol în această perioadă de diferențiere a gonadelor duce la inversarea sexului la masculi care, atunci când ajung la vârsta adultă, sunt femele complet funcționale (7) (8). Inversarea funcțională a sexului femelelor în cel al masculilor este, de asemenea, posibilă și a fost raportată în urma implantării de țesut testicular la mormoloci (9). Însă, deși expunerea la un inhibitor al aromatazei cauzează, de asemenea, inversarea funcțională a sexului la *X. tropicalis* (10), nu s-a demonstrat că aceasta apare la *X. laevis*. Din punct de vedere istoric, efectele substanțelor toxice asupra diferențierii gonadelor au fost evaluate prin examinarea histologică a gonadelor la metamorfoză, iar inversarea sexelor a putut fi determinată doar prin analizarea ratelor sexuale. Până de curând, nu a existat niciun mijloc de determinare directă a sexului genetic la *Xenopus*. Însă, o stabilire recentă a markerilor legați de sex la *X. laevis* permite determinarea sexului genetic și permite identificarea directă a animalelor cu sexul inversat (11).

10. La masculi, dezvoltarea juvenilă apare atunci când cresc nivelurile de testosteron din sânge, ceea ce corespunde dezvoltării caracteristicilor sexuale secundare, precum și dezvoltării testiculelor. La femele, estradiolul este produs de ovare, ducând la apariția vitelogeninei (VTG) în plasmă și a ovocitelor vitelogenice în ovar, precum și la dezvoltarea oviductelor (12). Oviductele reprezintă caracteristici sexuale secundare la femele, care funcționează în etapa de maturare a ovocitelor în timpul reproducerii. Ovocitele sunt acoperite cu un strat gelatinos atunci când trec prin oviduct și se colectează în ovisac, gata de fertilizare. Dezvoltarea oviductului pare a fi reglată de estrogeni întrucât dezvoltarea este corelată cu nivelurile de estradiol din sânge la *X. laevis* (13) și *X. tropicalis* (12). S-a raportat dezvoltarea oviductului la masculi în urma expunerii la compușii bifenili policlorurați (14) și 4-*terț*-octilfenol (15).

PRINCIPIUL TESTULUI

11. Modelul experimental implică expunerea embrionilor *X. laevis* din etapele 8-10 din NF, pe calea apei, la cel puțin patru concentrații diferite din substanța chimică de testat și martor(i) până la împlinirea a 10 săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF în martor, cu o probă secundară intermediară în etapa 62 din NF. Deşi poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea acestei căi de expunere în acest test până în prezent. În fiecare concentrație de testare există patru duplicate cu opt duplicate pentru fiecare martor utilizat. Punctele finale evaluate în cursul expunerii le includ pe cele care indică toxicitatea generalizată [și anume, mortalitatea, comportamentul anormal și determinările privind creșterea (lungime și greutate)], precum și punctele finale prevăzute a caracteriza modurile de acțiune ale toxicității endocrine care vizează procesele fiziologice mediate de estrogen, androgen sau tiroidă (și anume, histopatologia tiroidiană, histopatologia gonadei și a canalului gonadal, dezvoltarea anormală, vitelogenina din plasmă (opțional) și raportul sexului genotipic/fenotipic).

CRITERIILE DE VALIDITATE A TESTULUI

12. Se aplică următoarele criterii de valabilitate a testului:

— concentrația oxigenului dizolvat ar trebui să fie, pe parcursul testării, ≥ 40 % din valoarea saturației aerului;

▼M8

— temperatura apei ar trebui să fie în intervalul de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C;

— pH-ul soluției de testat ar trebui să fie menținută între 6,5 și 8,5, iar diferențele între duplicate și diferențele între tratamente nu ar trebui să depășească 0,5;

— ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare a concentrațiilor substanței utilizate în test în intervalul de ± 20 % din valorile medii măsurate;

— mortalitatea în perioada de expunere ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat în martori;

— viabilitate de ≥ 70 % la icrele alese pentru a începe studiul;

— timpul median până la etapa 62 din NF al martorilor ar trebui să fie de ≤ 45 de zile.

— Greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă 1,0 ± 0,2 și, respectiv, 11,5 ± 3 g.

13. Deşi nu este un criteriu de validitate, se recomandă ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză. Mortalitatea excesivă, care compromite un tratament, este definită ca > 4 mortalități (> 20 %) la 2 sau mai multe duplicate care nu pot fi explicate prin eroare tehnică. Cel puțin trei niveluri de tratament fără toxicitate evidentă ar trebui să fie disponibile pentru analiză. Semnele de toxicitate evidentă pot include, printre altele, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul rezervorului, înotare inversă sau neregulată, lipsa activității la apariție la suprafață și lipsa de reacție la stimuli, anomalii morfologice (de exemplu, diformități ale membrelor), leziuni hemoragice și un edem abdominal.

14. În cazul în care se observă o abatere de la criteriile de validitate a testului, consecințele ar trebui să fie luate în considerare în raport cu fiabilitatea rezultatelor testului, iar aceste abateri și considerații ar trebui să fie incluse în raportul testului.

DESCRIEREA METODELOR

Aparatură

15. Echipamentul obișnuit de laborator și, în special, următoarele:

(a) aparatură de control al temperaturii (de exemplu, aparate de încălzire sau aparate de răcire ajustabile la 22 ° ± 1 °C);

▼M8

(b) termometru;

(c) un microscop binocular pentru disecție și instrumente de disecție;

(d) cameră digitală cu o rezoluție de cel puțin 4 megapixeli și cu funcție micro (dacă este necesar);

(e) balanță analitică având o capacitate de măsurare până la 0,001 mg sau 1 µg;

(f) aparat de măsurare a oxigenului dizolvat și a pH-ului;

(g) aparat de măsurare a intensității luminii care poate măsura în lucși.

Apă

Sursă și calitate

16. Poate fi folosită orice apă de diluție care este disponibilă la nivel local (de exemplu, apa de izvor sau apa de la robinet filtrată prin filtru de cărbune) și care permite creșterea și dezvoltarea normală a *X. laevis* și ar trebui să existe dovezi privind creșterea normală în această apă. Întrucât calitatea apei locale poate varia în mod semnificativ de la o zonă la alta, ar trebui efectuată o analiză a calității apei, în special dacă nu sunt disponibile date istorice privind utilitatea respectivei ape pentru creșterea larvelor de amfibieni. În cazul în care se cunoaște calitatea relativ constantă a apei de diluție, ar trebui să se măsoare, înainte de începerea testului și/sau, spre exemplu, la șase luni, conținutul în metale grele (de exemplu, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd și Ni), anioni și cationi principali (de exemplu, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), pesticide, carbon organic total și materii solide în suspensie. Unele caracteristici chimice ale unei ape de diluție acceptabile sunt prezentate în apendicele 2.

Concentrația de iodid din apa de testare

17. Pentru ca glanda tiroidă să sintetizeze hormoni tiroidieni pentru a susține metamorfoza normală, ar trebui să existe o cantitate suficientă de iodid pentru larve printr-o combinație de surse apoase și alimentare. În prezent, nu există orientări stabilite în mod empiric pentru concentrații de iodid minime în alimente sau în apă pentru a asigura dezvoltarea corespunzătoare. Cu toate acestea, cantitățile de iodid disponibile pot afecta reactivitatea sistemului tiroidian la agenții activi asupra tiroidei, un factor de altfel cunoscut ca influențând activitatea bazală a glandei tiroide, ceea ce trebuie luat în considerare în momentul interpretării rezultatelor histopatologiei tiroidei. Pe baza unor lucrări anterioare, efectuarea cu succes a testului este demonstrată atunci când concentrațiile de iodid (Γ) din apa de diluție variază între 0,5 și 10 µg/l. În mod ideal, concentrația minimă de iodid din apa de diluție pe parcursul testului ar trebui să fie de 0,5 µg/l (adăugată sub formă de clorură de sodiu sau de potasiu). Dacă apa pentru testare este reconstituită din apă deionizată, ar trebui să se adauge iod într-o concentrație minimă de 0,5µg/l. Ar trebui să se raporteze concentrațiile de iodid măsurate din apa de testare (și anume, apa de diluție) și suplimentarea apei de testare cu iod sau cu alte săruri (dacă se utilizează). Conținutul de iod poate fi măsurat, de asemenea, în aliment(e), în plus față de apa de testare.

Sistemul de expunere

18. Testul a fost dezvoltat cu ajutorul unui sistem de diluare în regim dinamic. Componentele sistemului ar trebui să aibă componente care intră în contact cu apa confecționate din sticlă, oțel inoxidabil și/sau alt material inert din punct de vedere chimic. Bazinele de expunere ar trebui să fie acvarii din sticlă sau oțel inoxidabil, iar volumul utilizabil al acestora ar trebui să fie între 4,0 și 10,0 l (adâncimea minimă a apei de 10-15 cm). Sistemul ar trebui să poată susține toate concentrațiile de expunere, un martor și un martor tratat cu solvent, dacă este necesar, cu patru duplicate per tratament și opt în martori. Debitul fiecărui bazin ar trebui să fie constant, ținându-se cont atât de menținerea condițiilor biologice, cât și de expunerea la substanța chimică. Se recomandă ca debitele să fie adecvate (de exemplu, cel puțin 5 înlocuiri pe zi) pentru a evita scăderea concentrației chimice din cauza

▼M8

metabolismului atât a organismelor de testare, cât și a microorganismelor acvatice prezente în acvariile, sau căile abiotice de degradare (hidroliză, fotoliză) sau disipare (volatilizare, sorbție). Bazinele de tratament ar trebui să fie distribuite în mod aleatoriu într-o poziție în cadrul sistemului de expunere pentru a reduce eventualele efecte de poziție, inclusiv variațiile ușoare ale temperaturii, intensității luminii etc.). Informații suplimentare privind instalarea sistemelor de expunere în regim dinamic pot fi obținute prin intermediul Ghidului standard ASTM pentru efectuarea testelor de toxicitate acută pe materiale de testare cu specii de pești, macronevertebrate și amfibieni (16).

Livrarea substanței chimice: pregătirea soluțiilor de testat

19. Pentru a prepara soluțiile de testat în sistemul de expunere, soluția mamă a substanței chimice de testat ar trebui să fie dozată în sistemul de expunere prin intermediul unei pompe adecvate sau al unui alt aparat. Debitul soluției mamă ar trebui să fie calibrat în conformitate cu confirmarea analitică a soluțiilor de testat înainte de începerea expunerii și verificat din punct de vedere volumetric în mod regulat, pe durata testului. Soluția de testat din fiecare cameră ar trebui reînnoită ca volum de cel puțin 5 ori pe zi.

20. Metoda utilizată pentru a introduce substanța chimică de testat în sistem poate varia în funcție de proprietățile sale fizico-chimice. Prin urmare, înainte de test, ar trebui să se obțină informații de referință cu privire la substanța chimică, ce sunt relevantă pentru determinarea capacității de testare a acesteia. Informații utile cu privire la proprietățile specifice substanței chimice de testat includ formula structurală, greutatea moleculară, puritatea, stabilitatea în apă și la lumină, pK_a și K_{ow}, solubilitatea în apă (de preferință în mediul de testare) și presiunea vaporilor, precum și rezultatele unui test efectuat pentru biodegradabilitate rapidă [metoda de testare C.4 (17) sau C.29 (18)]. Solubilitatea și presiunea vaporilor pot fi folosite pentru a calcula constanta legii lui Henry, care va arăta dacă pot să se producă pierderi din cauza evaporării substanței chimice de testat. Efectuarea acestui test fără informațiile enumerate mai sus ar trebui să fie analizată cu atenție, deoarece proiectul studiului va depinde de proprietățile fizico-chimice ale substanței chimice de testat și, fără aceste date, rezultatele testelor ar putea fi dificil de interpretat sau inutile. Ar trebui să fie disponibilă o metodă analitică fiabilă de cuantificare a substanței chimice de testat în soluțiile de testare, cu precizia și limita de detecție cunoscute și raportate. Substanțele chimice solubile în apă pot fi dizolvate în alicote de apă de diluție la o concentrație care permite livrarea la concentrația de testare vizată în cadrul unui sistem în regim dinamic. Substanțele chimice lichide sau solide la temperatura camerei și moderat solubile în apă pot necesita saturatori lichid:lichid sau lichid:solid (de exemplu, coloană din vată de sticlă) (19). Deși poate fi posibilă, de asemenea, dozarea de substanțe chimice foarte hidrofobe prin intermediul hranei, există o experiență redusă în utilizarea respectivei căi de expunere în acest test.

21. Soluțiile de testat din concentrațiile alese se prepară prin diluarea unei soluții mamă. Soluția mamă ar trebui să se prepare, de preferință, prin simpla amestecare sau agitare a substanței chimice de testat în apa de diluție prin mijloace mecanice (de exemplu, amestecarea sau ultrasonificarea). Pentru obținerea unei soluții mamă cu o concentrație corespunzătoare se pot folosi coloane/sisteme de saturare sau metode de dozare pasivă (20). Se preferă utilizarea unui sistem de testare fără co-solvenți; însă substanțe chimice de testat diferite vor avea proprietăți fizico-chimice variate care vor necesita probabil abordări diferite pentru prepararea apei de expunere la o substanță chimică. Ar trebui să se depună toate eforturile pentru evitarea solvenților sau a purtătorilor deoarece: (1) anumiți solvenți pot avea

▼M8

ca rezultat toxicitatea și/sau răspunsuri nedorite sau neașteptate, (2) testarea substanțelor chimice peste solubilitatea lor în apă (astfel cum se poate întâmpla frecvent prin utilizarea solvenților) poate duce la determinări inexacte ale concentrațiilor efective, (3) utilizarea solvenților în teste pe termen mai lung poate conduce la un grad semnificativ de „biofilmare” asociat cu activitatea microbiană, ceea ce ar putea avea un impact asupra condițiilor de mediu și a capacității de a menține concentrațiile de expunere și (4) în absența unor date istorice care să demonstreze că solventul nu influențează rezultatul studiului, utilizarea solvenților necesită un tratament al martorului tratat cu solvent care are implicații semnificative asupra bunăstării animalelor, întrucât sunt necesare animale suplimentare pentru efectuarea testului. În ceea ce privește substanțele chimice care sunt dificil de testat, ar putea fi utilizat, în ultimă instanță, un solvent și ar trebui să se consulte documentul de orientare al OCDE privind testarea toxicității acvatice a substanțelor și amestecurilor dificile (21) pentru a determina cea mai bună metodă. Alegerea solventului va fi determinată de proprietățile chimice ale substanței chimice de testat și de disponibilitatea datelor istorice despre martor cu privire la solvent. În absența datelor istorice, caracterul adecvat al unui solvent ar trebui determinat înainte de efectuarea studiului definitiv. În cazul în care utilizarea unui solvent este inevitabilă și se produce activitatea microbiană (bio-filmare), se recomandă înregistrarea/raportarea bio-filmării pe rezervor (cel puțin săptămânal) pe durata testului. În mod ideal, concentrația solventului ar trebui să fie menținută constantă în martorul solvent și în toate tratamentele pentru testare. În cazul în care concentrația solventului nu este menținută constantă, în martorul solvent ar trebui utilizată cea mai mare concentrație în cadrul tratamentului pentru testare. În cazurile în care se utilizează solvent purtător, concentrațiile maxime ale solvenților nu ar trebui să depășească 100 µl/l sau 100 mg/l (21) și se recomandă să se mențină concentrația solventului la un nivel cât mai scăzut posibil (de exemplu, ≦ 20 µl/l) pentru a evita eventualele efecte ale solventului asupra punctelor finale măsurate (22).

Animalele de testare

Specia de testare

22. Specia de testare este *X. laevis*, deoarece aceasta este: (1) cultivată, de regulă, în laboratoare din întreaga lume, (2) ușor de obținut prin intermediul furnizorilor comerciali și (3) prezintă posibilitatea de a determina sexul genetic.

Îngrijirea și reproducerea exemplarelor adulte

23. Îngrijirea și reproducerea adecvată a *X. laevis* sunt descrise într-o orientare standardizată (23). Adăpostirea și îngrijirea *X. laevis* sunt descrise, de asemenea, de către Read (24). Pentru a induce reproducția, se injectează intraperitoneal între trei și cinci perechi de femele și masculi adulți cu gonadotropină corionică umană (hCG). Exemplarele femele și masculi, sunt injectate cu, de exemplu, aproximativ 800-1 000 UI și, respectiv, 500-800 UI de hCG dizolvată în soluție salină de 0,6-0,9 % (sau în soluția lui Ringer pentru broaște, o soluție salină izotonică pentru utilizare la amfibieni). Volumul de injecție ar trebui să fie de aproximativ 10 µl/g greutate corporală (~ 1 000 µl). Ulterior, cuplurile reproducătoare induse sunt ținute în bazine de mari dimensiuni, ferite de perturbări și în condiții statice pentru promovarea amplexusului. Fundul fiecărui bazin de reproducere ar trebui să fie prevăzut cu un fund fals din plasă din oțel inoxidabil (de exemplu, cu orificii de 1,25 cm), care să permită căderea icrelor pe fundul bazinului. Broaștele injectate cu hCG după-amiaza târziu vor depune, de regulă, cea mai mare parte a icrelor până la jumătatea dimineții zilei următoare. După ce se eliberează și se fertilizează o cantitate suficientă de icre, adulții ar trebui să fie îndepărtați din bazinele de reproducere. Icrele sunt

▼M8

apoi colectate și straturile gelatinoase sunt eliminate prin tratare cu L-cisteină (23). Ar trebui să se prepare o soluție de 2 % L-cisteină, iar pH-ul ar trebui să fie ajustat la 8,1 cu NaOH de 1 M. Această soluție de 21 °C se adaugă într-un vas Erlenmeyer de 500 ml care conține icrele de la o singură depunere și se rotește ușor timp de unu sau două minute, iar apoi se clătește bine de 6-8 ori cu apă de cultură la 21 °C. Icrele sunt apoi transferate într-un vas de cristalizare și se stabilește viabilitatea de > 70 %, cu anomalii minime la nivelul embrionilor care prezintă diviziunea celulară.

TIPUL TESTULUI

Concentrații de testare

24. Se recomandă utilizarea a minimum patru concentrații chimice și martori adecvați (inclusiv martori cu solvent, dacă este necesar). În general, se recomandă o separare a concentrației (factor de spațiere) de cel mult 3,2.

25. În scopul acestui test, rezultatele studiilor existente asupra amfibienilor ar trebui utilizate, în măsura în care este posibil, la determinarea celei mai mari concentrații de testare, astfel încât să se evite concentrațiile în mod evident toxice. Informațiile, spre exemplu, din relații cantitative structură-activitate, citirile încrucișate și datele provenite de la studiile existente pe amfibieni, cum ar fi testul metamorfozei la amfibieni, metoda de testare C.38 (25) și testul teratogenezei la embrionii de broască - *Xenopus* (23) și/sau testele efectuate asupra peștilor, cum ar fi metodele de testare C.48 , C.41 și C.49 (26) (27) (28), pot contribui la stabilirea acestei concentrații. Înainte de a derula testul LADDA, se poate realiza un experiment pentru stabilirea intervalului. Se recomandă ca expunerea pentru stabilirea intervalului să fie inițiată în termen de 24 de ore de la fertilizare și să fie continuată timp de 7-14 zile (sau mai mult, dacă este necesar), iar concentrațiile de testare să fie stabilite astfel încât intervalele dintre concentrațiile de testare să nu fie mai mari decât un factor de 10. Rezultatele obținute în urma experimentului de stabilire a intervalului ar trebui să servească la stabilirea celei mai mari concentrații de testare în cadrul LAGDA. Este de precizat că, în cazul în care trebuie să fie utilizat un solvent, ar putea fi stabilit caracterul adecvat al a solventului (și anume, dacă acesta poate avea un impact asupra rezultatului studiului) în cadrul studiului de stabilire a intervalului.

Duplicate în cadrul grupurilor de tratament și al martorilor

26. Ar trebui să se utilizeze cel puțin patru bazine duplicate pentru fiecare concentrație de testare și cel puțin opt duplicate pentru martori (și, martor cu solvent, dacă este necesar) (de exemplu, numărul de duplicate din martor și orice martor cu solvent ar trebui să fie de două ori mai mare decât numărul de duplicate din fiecare grup supus tratamentului, pentru a se asigura o putere statistică adecvată). Fiecare duplicat ar trebui să conțină cel mult 20 de animale. Numărul minim de animale prelucrate ar fi 15 (5 pentru subeșantioanele din etapa 62 din NF și 10 exemplare juvenile). Însă, se adaugă animale suplimentare în fiecare duplicat pentru a se lua în calcul posibilitatea mortalității, menținându-se în același timp un număr critic de 15.

PROCEDURA

Prezentarea testului

27. Testul este inițiat cu embrioni nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și poate continua până la dezvoltarea juvenilă. Animalele sunt examinate zilnic pentru identificarea mortalității și a oricăror semne de comportament anormal. În etapa 62 din NF, se colectează un subeșantion de larve (până la 5 animale per duplicat) și se examinează diferite puncte finale (tabelul 1). După ce toate animalele au ajuns în etapa 66 din NF, și anume, la încheierea metamorfozei (sau după 70 de zile de la inițierea testului, oricare dintre acestea survine mai întâi), se procedează în mod aleatoriu la sacrificare (dar fără subeșantionare) pentru a reduce numărul de animale (10 pe bazin) (a se

▼M8

vedea punctul 43), iar animalele rămase sunt în continuare expuse până la împlinirea a 10 săptămâni de la timpul median în etapa 62 din NF din martor. La încheierea testului (eșantionarea juvenilă), se efectuează măsurători suplimentare (tabelul 1).

Condiții de expunere

28. Apendicele 3 cuprinde o prezentare completă a parametrilor de testare. În perioada de expunere ar trebui măsurate zilnic oxigen dizolvat, temperatura și pH-ul soluțiilor de testare. Conductivitatea, alcalinitatea și duritatea se măsoară o dată pe lună. În cazul temperaturii apei din soluția de testat, diferențele între duplicate și tratamente (într-o singură zi) nu ar trebui să depășească 1,0 °C. De asemenea, în cazul pH-ului soluțiilor de testare, diferențele între duplicate și tratamente nu ar trebui să fie mai mari de 0,5.

29. Bazinele de expunere pot fi sifonate zilnic pentru a îndepărta alimentele neconsumate și deșeurile, astfel încât să se evite contaminarea încrucișată a bazinelor. Ar trebui să se acorde atenție reducerii la minim a stresului și traumei la animale, în special în timpul deplasării, al curățării acvariului și al manipulării. Condițiile/activitățile stresante, precum zgomotul puternic și/sau neîncetat, lovirea acvariilor, vibrațiile în bazin, ar trebui evitate.

Durata expunerii la substanța chimică de testat

30. Expunerea este inițiată la embrionii nou eclozați (etapele 8-10 din NF) și se continuă până la împlinirea a zece săptămâni după timpul median în etapa 62 din NF (≤ 45 de zile de la inițierea testului) în grupul martor. În general, durata LAGDA este de 16 săptămâni (maximum 17 săptămâni).

Inițierea testului

31. Pentru animalele părinți utilizate pentru inițierea testului ar fi trebuit să se dovedească anterior că se poate determina sexul genetic al progeniturilor lor (apendicele 5). După ce adulții au depus icre, embrionii sunt colectați, tratați cu cisteină pentru a elimina stratul de gelatină și verificați pentru viabilitate (23). Tratamentul cu cisteină permite manipularea embrionilor în timpul verificării fără lipirea de suprafețe. Verificarea are loc sub un microscop de disecție, utilizând o pipetă oculară de dimensiuni corespunzătoare pentru a elimina embrionii neviabili. Se preferă ca, pentru test, să se utilizeze icrele din cadrul unei singure depuneri care determină o viabilitate de peste 70 %. Embrionii din etapele 8-10 din NF sunt distribuiți în mod aleatoriu în bazine de tratare prin expunere care conțin un volum adecvat de apă de diluție până când fiecare bazin conține 20 de embrioni. Embrionii ar trebui să fie manipulați cu grijă pe durata acestui transfer pentru a reduce la minim stresul cauzat de manipulare și pentru a evita orice vătămare. La 96 ore după fertilizare, mormolocii ar trebui să se deplaseze spre partea superioară a coloanei de apă și să înceapă să se prindă de părțile laterale ale bazinului.

Regimul de hrănire

32. Modificarea ratei hranei și a ratei de alimentare în diferite etape ale vieții *X. laevis* constituie un aspect foarte important al protocolului LAGDA. Hrănirea excesivă a larvelor în etapa larvară conduce, de regulă, la o creștere a incidenței și gravității scoliozei (apendicele 8) și ar trebui evitată. Pe de altă parte, hrănirea necorespunzătoare în faza larvară conduce la rate de dezvoltare foarte variabile între martori, ceea ce poate să compromită puterea statistică sau să creeze confuzie la nivelul rezultatelor testului.

▼M8

Apendicele 4 prezintă regimul alimentar și de hrănire recomandat pentru larve și exemplarele juvenile pentru *X. laevis* în condiții dinamice, dar sunt permise alternative cu condiția ca organismele supuse testării să crească și să se dezvolte în mod satisfăcător. Este important de remarcat că, în cazul în care se măsoară punctele finale specifice sistemului endocrin, hrana ar trebui să nu conțină substanțe active endocrin, precum făina de soia.

Hrănirea larvelor

33. Hrana larvară recomandată constă în furaje de început pentru păstrăvi, discuri de alge *Spirulina* și chipsuri de alge (de exemplu, fulgi TetraFin®, Tetra, Germania) amestecați în apă de cultură (sau diluție). Acest amestec se administrează de trei ori pe zi în zilele lucrătoare și o dată pe zi în weekend. Mormolocii sunt hrăniți, de asemenea, cu creveți în saramură *Artemia* spp., cu nauplii de 24 de ore, de două ori pe zi în timpul săptămânii și o dată pe zi în weekend, începând cu ziua 8 după fertilizare. Hrana larvară, care ar trebui să fie consecventă în fiecare vas de testare, ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a animalelor de testare, pentru a asigura reproductibilitatea și transferabilitatea rezultatelor testului: (1) timpul median până la etapa 62 din NF la martori ar trebui să fie ≤ 45 de zile și (2) se recomandă o masă medie cuprinsă între 1,0 ± 0,2 g în etapa 62 din NF la martori.

Hrana puietului de pește

34. De îndată ce metamorfoza este completă, regimul de hrănire constă în alimentare cu broască cu mare de calitate superioară, de exemplu, Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, SUA) (apendicele 4). În cazul broscuțelor (puiet timpuriu), granulele sunt măcinate scurt într-un aparat de măcinat cafea sau blender ori zdrobite cu mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea acestora. După ce puietul ajunge la o dimensiune suficient de mare pentru a consuma granule, nu mai este necesară măcinarea sau zdrobirea. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Hrana puietului ar trebui să permită creșterea și dezvoltarea corespunzătoare a organismelor: se recomandă o greutate medie încadrată în valoarea 11,5 ± 3 g la puietul din martor la terminarea testului.

Chimie analitică

35. Înainte de inițierea testului, ar trebui să se determine stabilitatea substanței chimice de testat (de exemplu, solubilitatea, caracterul degradabil și volatilitatea) și toate metodele analitice necesare, de exemplu, folosind informațiile sau cunoștințele existente. Atunci când dozarea este realizată prin apa de diluție, se recomandă ca soluțiile de testat din fiecare bazin duplicat să fie analizate înainte de începerea testului, pentru a verifica performanța sistemului. În perioada de expunere, concentrațiile substanței chimice de testat se determină la intervale adecvate, de preferință în fiecare săptămână pentru cel puțin un duplicat din fiecare grup de tratament, cu rotire între duplicate din cadrul aceluiași grup de tratament în fiecare săptămână. Se recomandă ca rezultatele să fie bazate pe concentrații măsurate. Însă, în cazul în care concentrația substanței chimice de testat în soluție a fost menținută în mod satisfăcător, pe tot parcursul testului, în limitele valorii de ± 20 % din concentrația nominală, rezultatele pot fi bazate fie pe valori nominale, fie pe cele măsurate. De asemenea, coeficientul de variație (CV) al concentrațiilor de testat măsurate pe durata testării din cadrul unui tratament ar trebui să fie menținut la maxim 20 % pentru fiecare concentrație. Atunci când concentrațiile măsurate nu rămân în intervalul de 80-120 % din concentrația nominală (de exemplu, la testarea substanțelor chimice foarte biodegradabile sau adsorbtive), ar trebui să se determine și să se exprime concentrațiile de efect în raport cu media aritmetică a concentrației în cazul testelor în regim dinamic.

▼M8

36. Debitul apei de diluție și al soluției mamă ar trebui să fie verificat la intervale corespunzătoare (de exemplu, de trei ori pe săptămână) în perioada de expunere. În cazul substanțelor chimice care nu pot fi detectate la unele sau la toate concentrațiile nominale (de exemplu, din cauza degradării rapide sau a adsorbției în vasele de testare sau ca urmare a acumulării unei substanțe chimice marcate în organismele animalelor expuse), se recomandă ca rata de reînnoire a soluției de testare din fiecare cameră să fie adaptată pentru a menține concentrațiile de testare constante, în măsura posibilității.

Observații și măsurători ale punctelor finale

37. Punctele finale evaluate în cursul expunerii sunt cele care indică toxicitatea, inclusiv mortalitatea, comportamentul anormal, cum ar fi semnele clinice ale bolii și/sau toxicități generale, precum și determinările de creștere (lungime și greutate) și punctele finale ale patologiei care pot reacționa atât la toxicitatea generală, cât și la modurile endocrine de acțiune care vizează căile mediate de estrogen, androgen sau tiroidă. În plus, concentrația de plasmă VTG poate fi măsurată, opțional, la încheierea testului. Măsurarea VTG poate fi utilă pentru înțelegerea rezultatelor studiului în contextul mecanismelor endocrine în cazul substanțelor chimice suspectate de a perturba sistemul endocrin. Punctele finale și calendarul măsurătorilor sunt sintetizate în tabelul 1.

Tabelul 1

Prezentarea punctelor finale ale LAGDA

Puncte finale (*)	Zilnic	Eșantionare intermediară (eșantionare larvară)	Încheierea testului (eșantionare de puieți)
Mortalitate și anomalii	X		
Timp până la etapa 62 din NF		X	
Histopatologie (glanda tiroidă)		X	
Morfometrie (creștere în greutate și lungime)		X	X
Indice somatic al ficatului (LSI)			X
Raporturile sexului genetic/fenotipic			X
Histopatologie (gonade, canale de reproducere, rinichi și ficat)			X
Vitelogenina (VTG) (opțional)			X

(*) Toate punctele finale sunt analizate statistic.

Mortalitate și observații zilnice

38. Toate bazinele de testare ar trebui verificate zilnic pentru identificarea exemplarelor moarte, iar mortalitatea se înregistrează pentru fiecare bazin. Exemplarele moarte ar trebui să fie îndepărtate din bazinul de testare imediat după ce au fost observate. Stadiul de dezvoltare al animalelor moarte ar trebui să fie clasificat fie ca fiind stadiul 58 din NF (apariție pre-membru anterior), stadiul 58 din NF - stadiul 62 din NF - stadiul 63 din NF - stadiul 66 din NF (între stadiul 62 din NF și absorbția completă a cozii) sau stadiul 66 după NF (etapa post-larvară). Rate ale mortalității de peste 20 % pot să indice condiții de testare necorespunzătoare sau efecte toxice evidente ale substanței chimice de testat. Animalele tind să prezinte cea mai mare sensibilitate la evenimentele de mortalitate neindusă de substanțe chimice în primele câteva

▼M8

zile de dezvoltare după evenimentul de depunere a icrelor și în plin proces metamorfic. O astfel de mortalitate ar putea fi evidențiată de datele de control.

39. În plus, ar trebui să se înregistreze orice observație legată de comportamentul anormal, malformații evidente (de exemplu , scolioză) sau leziuni. Observațiile referitoare la scolioza ar trebui să fie numărate (incidența) și clasificate în funcție de severitate (de exemplu, nu este remarcabilă – NR, minim – 1, moderat – 2, sever – 3; apendicele 8). Ar trebui să se depună eforturi pentru a se asigura că limitarea prevalenței scoliozei moderate și grave (de exemplu, sub 10 % la martori) pe parcursul studiului, deși o mai mare prevalență a anomaliilor în martori nu ar constitui neapărat un motiv pentru oprirea testului. Comportamentul normal, în cazul exemplarelor larvare, este caracterizat prin suspendarea în coloana de apă cu coada ridicată deasupra capului, bătaia ritmică și regulată a înotătoarei caudale, ridicarea periodică la suprafață, opercularea și receptivitatea la stimuli. Un comportament anormal ar include, de exemplu, plutirea la suprafață, rămânerea pe fundul bazinului, înotare inversată sau neregulată, lipsa de activitate la suprafață și lipsa de reacție la stimuli. În cazul animalelor post-metamorfice, în plus față de comportamentele anormale de mai sus, ar trebui să se înregistreze diferențele mari de consum de hrană între tratamente. Malformațiile evidente și leziunile majore ar putea include anomalii morfologice (de exemplu, deformări ale membrelor), leziuni hemoragice, edem abdominal și infecții bacteriene sau fungice. Apariția leziunilor pe capul puieților, în poziția posterioară nărilor, ar putea fi indicații ale unor niveluri de umiditate insuficiente. Aceste determinări sunt calitative și ar trebui considerate analoage semnelor clinice de boală/stres și ar trebui să fie realizate prin comparații cu exemplarele din martori. În cazul în care rata apariției este mai mare la bazinele expuse decât în cazul martorilor, atunci acestea ar trebui considerate drept dovadă de toxicitate evidentă.

Sub-eșantionarea larvară

Prezentare generală a sub-eșantionării larvare:

40. Mormolocii care au ajuns în stadiul 62 din NF ar trebui să fie eliminați din bazine și fie eșantionați, fie mutați în următoarea parte a expunerii, într-un bazin nou, sau separați fizic de mormolocii rămași în același bazin cu un separator. Mormolocii sunt verificați în fiecare zi și se înregistrează ziua de studiu în care un mormoloc individual ajunge în stadiul 62 din NF. Caracteristica definitorie utilizată în această evaluare este forma capului. Atunci când capul a ajuns să fie redus ca dimensiune, astfel încât acesta este vizual de aproximativ aceeași lățime ca și trunchiul mormolocului, iar membrele anterioare se află la nivelul părții centrale a inimii, atunci exemplarul respectiv ar fi considerat ca ajungând în stadiul 62 din NF.

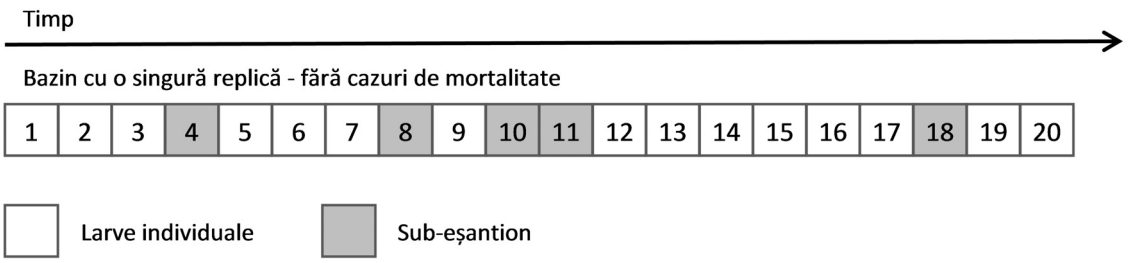
41. Obiectivul este de a eșantiona un număr total de cinci mormoloci aflați în stadiul 62 din NF în fiecare bazin duplicat. Aceasta ar trebui să fie efectuată cu totul în mod aleatoriu, dar decisă *a priori*. Un exemplu ipotetic de bazin duplicat este prezentat în **figura 1**. În cazul în care există 20 de mormoloci supraviețuitori într-un anumit bazin atunci când primul exemplar ajunge în stadiul 62 din NF, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 20. Mormolocul nr. 1 este primul exemplar care va ajunge în stadiul 62 din NF, iar mormolocul nr. 20 este ultimul exemplar dintr-un bazin care va ajunge în stadiul 62 din NF. În mod similar, dacă există 18 larve supraviețuitoare într-un bazin, ar trebui să se aleagă cinci numere aleatorii de la 1 la 18. Aceasta ar trebui să fie efectuată pentru fiecare bazin duplicat atunci când primul exemplar supus testării ajunge în stadiul 62 din NF. În cazul în care există rate de mortalitate în cadrul eșantionării în stadiul 62 din NF, probele rămase trebuie să fie prelevate din nou în mod aleatoriu pe baza numărului de larve rămase până în stadiul 62 din NF și a numărului de probe suplimentare necesare pentru a se ajunge la un total de cinci probe provenite din

▼**M8**

respectivul duplicat. În ziua în care un mormoloc ajunge în stadiul 62 din NF, se face trimitere la diagrama de eșantionare întocmită pentru a stabili dacă exemplarul respectiv este selectat sau separat fizic de mormolocii rămași pentru a fi expus în continuare. În exemplul prezentat (figura 1), primul exemplar care urmează să ajungă în stadiul 62 din NF (și anume, caseta nr. 1) este separat fizic de celelalte larve, este expus în continuare și este înregistrată ziua de studiu în care exemplarul ajunge în stadiul 62 din NF. Ulterior, exemplarele nr. 2 și 3 sunt tratate în același mod ca și nr. 1, iar apoi exemplarul nr. 4 este prelevat pentru creștere și histologia tiroidiană (conform acestui exemplu). Această procedură continuă până când cel de al 20-lea exemplar fie se alătură celorlalte exemplare care au trecut de stadiul 62 din NF, fie este eșantionat. Procedura de selecție aleatorie utilizată trebuie să asigure pentru fiecare organism testat probabilitatea egală de a fi selectat. Acest lucru poate fi realizat prin utilizarea oricărei metode de selecție aleatorie, dar impune, de asemenea, ca fiecare mormoloc să fie prins în plasă la un anumit moment în perioada de subeșantionare în stadiul 62 din NF.

Figura 1

Exemplu ipotetic de regim de eșantionare în stadiul 62 din NF, pentru un singur bazin duplicat



42. Pentru subeșantionarea larvară, punctele finale obținute sunt: (1) timpul până în stadiul 62 din NF (și anume, numărul de zile între fertilizare și stadiul 62 din NF), (2) anomaliile externe, (3) morfometria (de exemplu, greutate și lungime) și (4) histologia tiroidei.

Eutanasierea mormolocilor

43. Subeșantionul de mormoloci în stadiul 62 din NF (5 exemplare per duplicat) ar trebui să fie eutanasiați prin imersiune timp de 30 de minute în cantități adecvate (de exemplu, 500 ml) de soluție anestezică (de exemplu, 0,3 % soluție de metan sulfonat de tricaină MS-222, CAS.886-86-2). Soluția MS-222 ar trebui să fie tamponată cu bicarbonat de sodiu la o valoare a pH-ului de aproximativ 7,0, deoarece soluția MS-222 netamponată este acidă și iritantă pentru pielea broaștei, determinând o absorbție scăzută și stresarea suplimentară inutilă a organismelor.

44. Cu ajutorul unei plase de tip sită se scoate un mormoloc din camera experimentală și se transportă (plasează) în soluția de eutanasiere. Exemplarul este eutanasiat în mod corespunzător și este pregătit pentru autopsie atunci când nu reacționează la stimuli externi, cum ar fi ciupirea membrului din spate cu o pereche de forceps.

Morfometrie (greutate și lungime)

45. Măsurătorile greutății în stare umedă (cea mai apropiată valoare mg) și lungimea bot-cloacă (SVL) (la valoarea cea mai apropiată de 0,1 mm) pentru fiecare mormoloc ar trebui efectuate imediat după ce acesta nu mai reacționează ca urmare a anesteziei (figura 2a). Pentru măsurarea SVL dintr-o fotografie se poate utiliza un software de analiză a imaginii.

▼M8

Mormolocii ar trebui uscați înainte de cântărire pentru a îndepărta excesul de apă. După măsurarea dimensiunii corpului (greutate și SVL) ar trebui să se înregistreze și să se noteze orice anomalii morfologice brute și/sau orice semne clinice ale toxicității, precum scolioza (a se vedea apendicele 8), peteșiile și hemoragia și se recomandă documentarea digitală. Este de precizat că peteșiile reprezintă mici pete hemoragice de culoare roșie sau vișinie apărute pe piele ca urmare a rupturilor capilare.

Colectarea și fixarea țesuturilor

46. Pentru subeșantionarea larvelor, se evaluează glandele tiroide pentru histologie. Partea posterioară a trunchiului inferior până la membrele posterioare se îndepărtează și se elimină. Carcasa tăiată este fixată în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Ar trebui să se procedeze la agitarea sau circularea corespunzătoare a fixatorului pentru fixarea țesuturilor de interes. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

Histologia glandei

47. Fiecare subeșantion de larve (țesuturi fixe) este analizat din punct de vedere histologic în ceea ce privește glandele tiroidei, și anume diagnostic și grad de gravitate (29) (30).

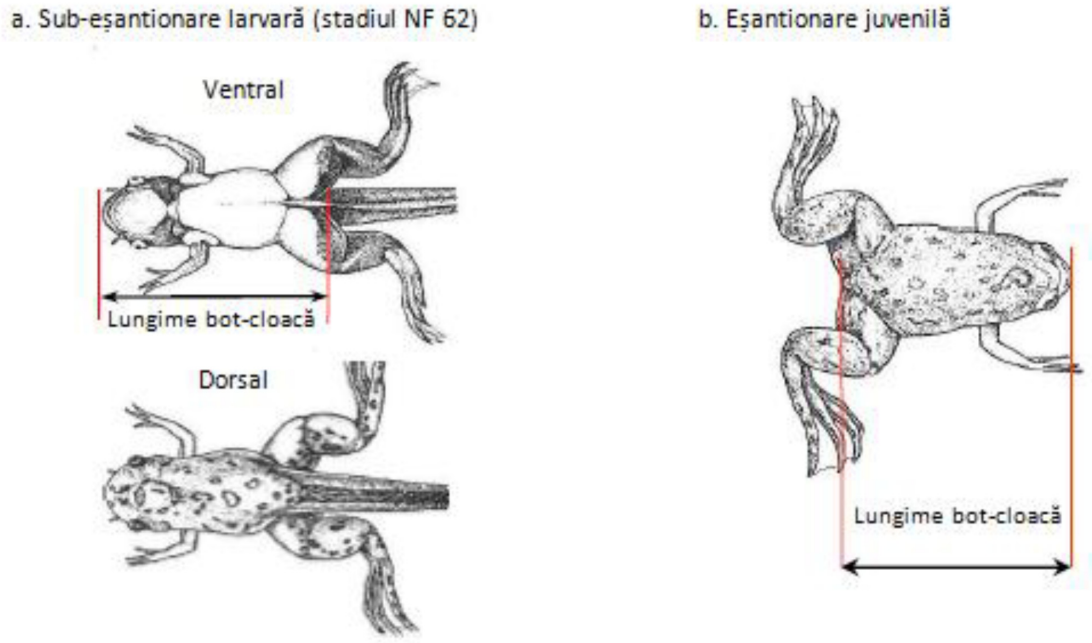


Figura 2: Repere pentru măsurarea lungimii bot-cloacă pentru LAGDA în stadiul 62 din NF (a) și pui de broască (b). Caracteristicile definitorii ale stadiului 62 din NF (a): capul prezintă aceeași lățime cu trunchiul, lungimea nervului olfactiv este mai scurtă decât diametrul bulbului olfactiv (vedere dorsală), iar membrele posterioare se află la nivelul inimii (vedere ventrală). Imagini adaptate din materialul Nieuwkoop și Faber (1994).

Sfârșitul expunerii larvare

48. Având în vedere numărul inițial de mormoloci, se preconizează că este probabil să existe un procent redus de exemplare care nu se dezvoltă normal și care nu încheie procesul de metamorfoză (stadiul 66 din NF) într-un interval rezonabil de timp. Perioada de expunere a larvelor nu ar

▼M8

trebui să depășească 70 de zile. Orice mormoloci rămași la finalul acestei perioade ar trebui să fie eutanasiați (a se vedea punctul 43), greutatea lor în stare umedă și SVL ar trebui să fie măsurate, aceștia ar trebui să fie clasificați pe stadii conform Nieuwkoop și Faber, 1994 și se notează orice anomalii legate de dezvoltare.

Sacrificarea după stadiul 66 din NF

49. Zece exemplare din fiecare bazin ar trebui să se dezvolte în continuare din stadiul 66 din NF (resorbția completă a cozii) până la încetarea expunerii. Prin urmare, după ce toate animalele au ajuns în stadiul 66 din NF sau după 70 de zile (oricare dintre acestea survine mai întâi), ar trebui să se procedeze la sacrificare. Animalele care au trecut de stadiul 66 din NF și care nu vor continua să fie expuse ar trebui să fie selectate în mod aleatoriu.

50. Exemplarele care nu sunt selectate pentru continuarea expunerii sunt eutanasiate (a se vedea punctul 43). Pentru fiecare exemplar se măsoară stadiul de dezvoltare, greutatea umedă și SVL (figura 2b) și se realizează o autopsie macroscopică. Sexul fenotipic (pe baza morfologiei gonadei) este notat ca sex feminin, masculin sau nedeterminat.

Eșantionare de puieți

Prezentarea eșantionării de puieți

51. Exemplarele rămase continuă să fie expuse până la 10 săptămâni după timpul median în stadiul 62 din NF, în martorul cu apa de diluție (și/sau în martorul cu solvent, dacă este cazul). La sfârșitul perioadei de expunere, animalele rămase (maximum 10 broaște pentru fiecare duplicat) sunt eutanasiate și se măsoară sau se evaluează și se înregistrează diferitele puncte finale: (1) morfometria (greutate și lungime), (2) ratele sexului fenotipic/genotipic, (3) greutatea ficatului (indicele somatic al ficatului), (4) histopatologie (gonade, canale de reproducere, ficat și rinichi) și opțional (5) valoarea VTG a plasmei.

Eutanasierea broaștelor

52. Probele de puieți, broaștele după etapa metamorfică, sunt eutanasiate printr-o injecție intraperitoneală de anestezic, de exemplu, MS-222 de 10 % într-o soluție tamponată de fosfat adecvată. Eșantionarea broaștelor poate fi efectuată după ce acestea nu mai reacționează (de obicei, în aproximativ 2 minute de la injectare, în cazul în care se utilizează MS-222 de 10 % într-o doză de 0,01 ml per gram de broască). Chiar dacă puii de broaște ar putea fi scufundați într-o concentrație mai mare de anestezic (MS-222), experiența a demonstrat că este nevoie de mai mult timp pentru ca acestea să fie anesteziate utilizând această metodă și ar fi posibil ca durata să nu fie adecvată pentru a permite eșantionarea. Injectarea asigură o eutanasiere eficientă și rapidă înainte de eșantionare. Eșantionarea nu ar trebui să înceapă până când nu este confirmată lipsa de reacție a broaștelor, pentru a se obține certitudinea că exemplarele sunt moarte. În cazul în care broaștele manifestă semne de suferință considerabilă (se poate prezice în mod sigur suferința foarte gravă și decesul) și considerați se consideră că aceștia sunt muribunzi, animalele ar trebui anesteziate și eutanasiate și tratate drept mortalitate în scopul analizei datelor. Atunci când o broască este eutanasiată din cauza morbidității, acest aspect ar trebui observat și raportat. În funcție de momentul în care broasca este eutanasiată în timpul studiului, se poate proceda la reținerea acesteia pentru analiza histopatologică (fixarea broaștei pentru o posibilă histopatologie).

Morfometrie (greutate și lungime)

53. Măsurătorile greutății umede și ale SVL (figura 2 b) sunt identice cu cele prezentate pentru subeșantionarea larvară.

▼M8

Valoarea VTG din plasmă (opțiune)

54. VTG este un marker biologic acceptat la scară largă care rezultă în urma expunerii la substanțe chimice estrogenice. În cazul LAGDA, valoarea VTG din plasmă poate fi măsurată opțional în cadrul eșantioanelor de puieți (acest lucru poate fi relevant în special în cazul în care substanța chimică de testat este suspectată ca fiind un estrogen).

55. Membrele posterioare ale puieților eutanasiați sunt tăiate, iar sângele este colectat cu ajutorul unui capilar heparinizat (deși ar putea fi adecvate metode alternative de colectare a sângelui, cum ar fi puncția cardiacă). Sângele este expulzat într-o eprubetă de microcentrifugă (de exemplu, cu un volum de 1,5 ml) și centrifugat pentru obținerea plasmei. Probele de plasmă ar trebui păstrate la o temperatură de cel mult -70 °C până la determinarea VTG. Concentrația VTG din plasma poate fi măsurată printr-un test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA) (apendicele 6) sau printr-o metodă alternativă, cum ar fi spectrometria de masă (31). Se preferă anticorpi specifici speciei datorită unei sensibilități sporite.

Determinarea sexului genetic

56. Sexul genetic al fiecărui pui de baltă este evaluat pe baza markerilor dezvoltați de Yoshimo *et al.* (11). Pentru determinarea sexului genetic, se colectează și se păstrează (parțial sau integral), într-o eprubetă de microcentrifugă, un membru posterior (sau orice alt țesut) îndepărtat în timpul disecției (la broaște, pot fi obținute probe din orice țesut). Țesuturile pot fi păstrate la temperatura de -20 °C sau la temperaturi mai mici până la izolarea acidului dezoxiribonucleic (ADN). Izolarea ADN-ului din țesuturi poate fi realizată cu ajutorul unor kituri disponibile în comerț, iar analiza pentru detectarea prezenței sau absenței marcatorului este efectuată printr-o metodă de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (apendicele 5). În general, concordanța dintre sexul histologic și genotip între animalele din grupul martor la momentul eșantionării puieților în grupurile martor este mai mare de 95 %.

Colectarea și fixarea țesuturilor pentru histopatologie

57. Gonadele, canalele de reproducere, rinichii și ficatul sunt colectate pentru analiza histologică în timpul eșantionării finale. Se deschide cavitatea abdominală și se disecă și se cântărește ficatul. Apoi, se îndepărtează cu atenție organele digestive (de exemplu, stomacul, intestinele) din partea inferioară a abdomenului pentru a evidenția gonadele, rinichii și canalele de reproducere. Ar trebui să fie notate orice anomalii morfologice evidente ale gonadelor. În cele din urmă, ar trebui îndepărtate membrele posterioare dacă nu au fost îndepărtate în prealabil în vederea colectării sângelui. Ficatul colectat și carcasa cu gonadele lăsate *in situ* ar trebui să fie introduse imediat în fixatorul Davidson. Volumul fixatorului din rezervor ar trebui să fie de cel puțin 10 ori mai mare decât volumul aproximativ al țesuturilor. Toate țesuturile rămân în fixatorul Davidson timp de cel puțin 48 de ore, dar nu mai mult de 96 de ore, după care acestea sunt clătite cu apă deionizată și păstrate în formalină neutră tamponată 10 % (1) (29).

Histopatologie

58. Fiecare eșantion de puiet este supus evaluării histologice pentru identificarea patologiei la gonade, canale de reproducere, rinichi și țesut hepatic, și anume diagnostic și grad de gravitate (32). Din această evaluare reiese, de asemenea, fenotipul gonadei (de exemplu, ovar, testicul, hermafrodit) și, împreună cu măsurătorile individuale ale sexului genetic, aceste observații pot fi utilizate pentru a calcula raporturile sexului fenotipic/genotipic.

▼M8

DATE ȘI RAPORTARE

Analiza statistică

59. LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative (greutate, SVL, LSI, VTG), (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (și anume, zile până la stadiul 62 din NF de la momentul inițierii testului) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice.

60. Se recomandă ca modelul testului și selecția testului statistic să permită existența unei puteri adecvate pentru detectarea schimbărilor de importanță biologică în punctele finale în cazul în care va fi raportată valoarea CFEO sau CEx. Analizele statistice ale datelor (în general, baza medie a duplicatelor) ar trebui, de preferință, să urmeze procedurile descrise în documentul intitulat „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" (33) (Metode actuale de analiză statistică a datelor privind ecotoxicitatea: un ghid pentru aplicare). Apendicele 7 al acestei metode de testare prezintă arborele decizional de analiză statistică recomandat și orientarea pentru tratarea datelor și alegerea celui mai adecvat test sau model statistic care să fie utilizat în LAGDA.

61. Datele provenite din eșantionarea puieților (de exemplu, creștere, LSI) ar trebui să fie analizate pentru fiecare sex genotipic separat, deoarece sexul genotipic este determinat pentru toate broaștele.

Considerații privind analiza datelor

Utilizarea de duplicate și tratamente compromise

62. Duplicatele și tratamentele pot fi compromise din cauza excesului de mortalitate prin toxicitate evidentă, boală sau eroare tehnică. Dacă un tratament este compromis din cauza unei boli sau a unei erori tehnice, ar trebui să existe trei tratamente necompromise cu trei duplicate necompromise disponibile pentru analiză. În cazul în care apare o toxicitate evidentă la tratamentul (tratamentele) puternic(e), este de preferat ca cel puțin trei niveluri de tratament cu trei duplicate necompromise să fie disponibile pentru analiză [în concordanță cu abordarea privind concentrația maximă tolerată din orientările OCDE privind testele (34)]. În plus față de mortalitate, semnele de toxicitate evidentă pot include efecte comportamentale (de exemplu, plutirea la suprafață, stagnarea pe fundul bazinului, mișcarea inversă sau neregulată, lipsa activității de revenire la suprafață), leziuni morfologice (de exemplu, leziuni hemoragice, edem abdominal) sau inhibarea reacțiilor alimentare normale la compararea calitativă cu exemplarele martor.

Martorul tratat cu solvent

63. La încheierea testului, ar trebui efectuată o evaluare a potențialelor efecte ale solventului (dacă se utilizează). Aceasta se realizează printr-o comparație statistică între grupul de martori solvent și grupul de martori apă de diluție. Cele mai relevante puncte finale care trebuie luate în considerare în această analiză sunt factorii determinanți ai creșterii (greutate și lungime), deoarece aceștia pot fi afectați prin toxicități generalizate. În cazul în care se detectează diferențe semnificative din punct de vedere statistic la aceste puncte finale între grupul cu martor tratat cu apă de diluție și grupul cu martor tratat cu solvent, ar trebui să se recurgă la cea mai bună apreciere profesională pentru a determina dacă validitatea testului este compromisă. În cazul în care cei doi martori diferă, tratamentele expuse la substanța chimică ar trebui comparate cu martorul tratat cu solvent, cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă o comparație cu martorul tratat cu apă de diluție. În cazul în care nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între cele două grupuri cu martori, se recomandă ca tratamentele expuse la substanța chimică de testat să fie comparate cu cele ale grupului (grupul cu martor tratat cu solvent și grupul cu martor tratat cu apă de diluție), cu excepția cazului în care se cunoaște faptul că se preferă numai comparația cu grupul cu martor tratat cu apă de diluție sau cu grupul cu martor tratat cu solvent.

▼M8

Raportul testului

64. Raportul testului ar trebui să includă următoarele:

Substanța chimică de testat:

— proprietăți de natură fizică și, dacă este relevant, proprietăți fizico-chimice;

— Substanță monocomponentă:

aspectul fizic, solubilitatea în apă și alte proprietăți fizico-chimice relevante;

datele de identificare chimică, precum denumirea IUPAC sau CAS, numărul CAS sau codul său InChI, formula structurală, puritatea, identitatea chimică a impurităților, după cum este necesar și fezabil din punct de vedere practic etc. (inclusiv conținutul în carbon organic, dacă este necesar).

— Substanță multicomponentă, UVCB și amestecuri:

în măsura în care este posibil, caracterizată prin identitatea chimică (a se vedea mai sus), apariția cantitativă și proprietățile fizico-chimice relevante ale constituenților.

Specii de testare:

— numele științific, sușa, dacă există, sursa și metoda de colectare a ouălor fertilizate, precum și manipularea ulterioară.

— incidența scoliozei la martorii istorici pentru cultura mamă utilizată.

Condiții de testare:

— perioada (perioadele) de expunere la lumină;

— modelul de testare (de exemplu, dimensiunea camerei, volumul materialului și al apei, numărul camerelor de testare și al duplicatelor, numărul organismelor de testare pe duplicat);

— metoda de preparare a soluțiilor mamă și frecvența reînnoirii (ar trebui să se specifice agentul de solubilizare și concentrația sa, atunci când este folosit);

— metoda de dozare a substanței chimice de testat (*de exemplu*, pompe, sisteme de diluare);

— eficiența de recuperare a metodei și concentrațiile de testare nominale, limita de cuantificare, mediile valorilor măsurate și abaterile lor standard în vasele de testare și metoda prin care acestea au fost obținute, precum și dovezi că măsurătorile se referă la concentrațiile substanței de testat în soluție reală;

— caracteristicile apei de diluție: pH, duritate, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat, nivelul clorului rezidual (dacă a fost măsurat), iodul total, carbonul organic total (dacă a fost măsurat), solide în suspensie (dacă au fost măsurate), salinitatea mediului de testare (dacă a fost măsurată) și alte măsurători făcute;

— concentrațiile de testare nominale, mediile valorilor măsurate și deviațiile standard ale acestora;

— calitatea apei din vasele de testare, pH, temperatură (zilnic) și concentrația oxigenului dizolvat;

▼**M8**

— informații precise legate de hrană [*de exemplu*, tipul de aliment(e), sursa, cantitatea administrată și frecvența].

Rezultate:

— dovezi privind faptul că martorii au îndeplinit criteriile de validitate;

— date privind martorul (plus martorul tratat cu solvent, atunci când este utilizat) și grupurile de tratament, după cum urmează: mortalitatea și anomaliile observate, timpul până la etapa NF 62, evaluarea histologiei tiroidei (doar proba de larve), creșterea (greutatea și lungimea), LSI (numai proba de pești tineri), ratele sexului genetic/fenotipic (numai pentru proba de pești tineri), rezultatele examenului histopatologic pentru gonade, canalele de reproducere, rinichi și ficat (numai proba de pești tineri) și valoarea VTG a plasmei (numai pentru proba de pești tineri, dacă este prelevată);

— abordarea analizei statistice și a tratării datelor (testul statistic sau modelul utilizat);

— concentrația fără efect observat (CFEO) pentru fiecare răspuns evaluat;

— concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) pentru fiecare răspuns evaluat (la $\alpha = 0,05$); CEx pentru fiecare răspuns evaluat, dacă este cazul, precum și intervalele de încredere (*de exemplu* 95 %) și un grafic al modelului ajustat utilizat pentru calcularea lor, panta curbei concentrație-răspuns, formula modelului de regresie, parametrii estimați ai modelului și erorile standard ale acestora.

— orice abatere de la metoda de testare și abateri de la criteriile de acceptare, precum și considerații privind eventualele consecințe asupra rezultatului testului.

65. Pentru rezultatele măsurărilor punctelor finale, ar trebui să fie prezentate valorile medii și deviațiile lor standard (în funcție de duplicat și concentrație, dacă este posibil).

66. Timpul mediu până la etapa NF 62 ar trebui calculat și prezentat ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora. De asemenea, pentru tratamente, o medie de tratament ar trebui calculată și prezentată ca medie a medianelor duplicatelor și a deviației standard a acestora.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

(1) Agenția SUA pentru protecția mediului (2013). Validarea testului privind creșterea și dezvoltarea larvelor de amfibieni: Integrated Summary Report.

(2) OCDE (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 150), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(3) Nieuwkoop PD și Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, SUA.

(4) Kloas W și Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I și Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S și Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K și Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K și Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T și Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S și Degitz SJ. (2009) b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J și Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR și Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A și Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, SUA.

(17) Capitolul C.4 din prezenta anexă, Test de biodegradabilitate rapidă.

(18) Capitolul C.29 din prezenta anexă, Biodegradabilitatea rapidă - CO2 în vase închise ermetic (testul Headspace).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL și Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 23), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ și Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, SUA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capitolul C.38 din prezenta anexă, Analiza metamorfozei la amfibieni.

(26) Capitolul C.48 din prezenta anexă, Analiza reproducerii pe termen scurt la pești.

(27) Capitolul C.41 din prezenta anexă, Testul de dezvoltare sexuală a peștilor.

(28) Capitolul C.49 din prezenta anexă, Testul de toxicitate acută la embrionii de pești (FET).

(29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (nr. 82) Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC și Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG și Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 228), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (nr. 54), Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

Apendicele 1

DEFINIȚII

Punctele finale apicale: care provoacă efecte la nivel de populație.

Substanță chimică: o substanță sau un amestec

ELISA: test de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic

CEx: (concentrație efectivă pentru un efect x %) reprezintă concentrația care determină o valoare x % a unui efect asupra organismelor testate într-un timp de expunere dat în comparație cu un martor. De exemplu, o valoare EC50 este concentrația estimată să producă un efect asupra unui punct final de testare la 50 % dintr-o populație expusă într-un timp de expunere stabilit.

zdf: Zile după fertilizare

Test în regim dinamic: un test cu flux continuu de soluții de testare prin sistemul de testare în perioada de expunere.

Axa HPG: axul hipotalamo-hipofizo-gonadal

IUPAC: Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată.

Concentrația cea mai scăzută pentru care este observat un efect (LOEC) este cea mai scăzută concentrație testată a unei substanțe chimice de testat la care se constată un efect de reducere semnificativ din punct de vedere statistic asupra creșterii (la $p < 0,05$) în comparație cu martorul. Însă toate concentrațiile de testare mai mari decât LOEC ar trebui să aibă un efect nociv egal cu sau mai mare decât cele observate la LOEC. Atunci când aceste două condiții menționate nu pot fi îndeplinite, ar trebui furnizată o explicație completă a modului de alegere a LOEC (și, prin urmare, CFEO). Apendicele 7 oferă orientări în acest sens.

Concentrația letală medie (LC50): este concentrația unei substanțe chimice de testat care este considerată letală la 50 % din organismele testate pe durata testului.

Concentrația fără efect observat (CFEO): este concentrația de testare imediat sub LOEC care, atunci când este comparată cu martorul, nu are niciun efect semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) într-un timp de expunere stabilit.

SMILES: Specificație pentru înregistrarea simplificată a structurii moleculare sub formă de text liniar.

Substanța chimică de testat: Orice substanță sau amestec testat utilizând această metodă de testare.

UVCB: substanțe cu compoziție necunoscută sau variabilă, produși de reacție complexă sau materiale biologice.

VTG: vitelogenina este o fosfolipoglicoproteină precursoare a proteinelor din vitellus care în mod normal apare la femelele active din punct de vedere sexual din toate speciile ovipare.

▼**M8**

Apendicele 2

ANUMITE CARACTERISTICI CHIMICE ALE APEI DE DILUȚIE ACCEPTABILE

Substanță	Concentrație-limită
Particule în suspensie	5 mg/l
Carbon organic total	2 mg/l
Amoniac neionizat	1 µg/l
Clor rezidual	10 µg/l
Totalul pesticidelor organofosforoase	50 ng/l
Total pesticide organoclorurate plus bifenili policlorurați	50 ng/l
Total clor organic	25 ng/l
Aluminiu	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Crom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Cupru	1 µg/l
Fier	1 µg/l
Plumb	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinc	1 µg/l
Cadmiu	100 ng/l
Mercur	100 ng/l
Argint	100 ng/l

▼**M8**

Apendicele 3

CONDIȚII DE TESTARE PENTRU LAGDA

1. Specia de testare	*Xenopus laevis*
2. Tipul de testare	Continuu în regim dinamic
3. Temperatura apei	Temperatura nominală este de 21 °C. Temperatura medie pe durata testului este de 21 ± 1 °C (diferențele între duplicate și între tratamente nu ar trebui să depășească 1,0 °C)
4. Calitatea iluminatului	Becuri fluorescente (spectru larg) de 600-2000 lucși (lumeni/m^2) la suprafața apei
5. Perioadă de expunere la lumină	12 h de lumină, 12 h de întuneric
6. Volumul soluției de testare și vasul de testare (bazin)	4 - 10 l (adâncime a apei de minimum 10-15 cm) Bazin din sticlă sau oțel inoxidabil
7. Schimburile de volum ale soluțiilor de testare	Constante, având în vedere menținerea condițiilor biologice și expunerea la substanța chimică (de exemplu, 5 reînnoiri pe zi ale volumului în bazin)
8. Vârsta organismelor de testare la inițiere	stadiile 8-10 din Nieuwkoop și Faber (NF)
9. Numărul de organisme per duplicat	20 de exemplare (embrioni)/bazin (duplicat) în momentul inițierii expunerii și 10 exemplare (exemplare tinere)/bazin (duplicat) după stadiul 66 din NF până la încetarea expunerii
10. Număr de tratamente	Minim 4 tratamente cu substanțe chimice de testat, plus martorul (martorii) adecvat (adecvați)
11. Numărul de duplicate per tratament	4 duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 8 duplicate pentru martor(i)
12. Numărul de organisme per concentrație de testare	Minim 80 de duplicate per tratament pentru substanța chimică de testat și 160 de animale pentru martor(i)
13. Apa de diluție	Orice apă care permite creșterea și dezvoltarea normală a speciei *X. laevis* (de exemplu, apă de izvor sau apă de la robinet filtrată cu cărbune)
14. Aerarea	Nu este necesară, dar este posibilă aerarea bazinelor în cazul în care nivelurile de oxigen dizolvat scad sub limitele recomandate, iar creșterea debitului soluției de testare este maximizată.
15. Oxigenul dizolvat din soluția de testare	Oxigen dizolvat: ≥ 40 % din valoarea saturației aerului sau ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH-ul soluției de testare	6,5-8,5 (diferențele între tratamente și între duplicate nu ar trebui să depășească 0,5)
17.	Duritatea și alcalinitatea soluției de testare	10-250 mg $CaCO_3$/l
18.	Regimul de hrănire	(A se vedea apendicele 4)
19.	Perioadă de expunere	Din stadiile 8-10 din NF până la zece săptămâni după perioada mediană până la stadiul 62 din NF în grupul martor cu apă și/sau cu solvent (maxim 17 săptămâni)
20.	Puncte finale biologice	Mortalitatea (și anomalii aparente), timpul până la stadiul 62 din NF (eșantion de larve), evaluarea histologiei tiroidei (eșantion de larve), creșterea (greutatea și lungimea), indicele somatic al ficatului (eșantionul de puieți), ratele sexului genetic/fenotipic (eșantionul de puieți), histopatologia pentru gonade, canalele de reproducere, rinichi și ficat (eșantion de puieți) și valoarea VTG din plasmă (opțional, eșantionul de puieți)
21.	Criterii de validitate a testului	Oxigenul dizolvat ar trebui să fie de > 40 % din valoarea saturației aerului; temperatura medie a apei ar trebui să fie în limitele valorii de 21 ± 1 °C, iar diferențele între duplicate și între tratamente ar trebui să fie < 1,0 °C; pH-ul soluției de testare ar trebui să fie cuprins între 6,5 și 8,5; mortalitatea în martor ar trebui să fie ≤ 20 % în fiecare duplicat, iar perioada medie până la stadiul 62 din NF în martor ar trebui să fie ≤ 45 zile; greutatea medie a organismelor de testat în etapa 62 din NF și la încheierea testului la martori și martori tratați cu solvent (dacă se utilizează) ar trebui să atingă 1,0 ± 0,2 și, respectiv, 11,5 ± 3 g; ar trebui să existe dovezi care să demonstreze menținerea satisfăcătoare în soluție a concentrațiilor substanței chimice de testat în limitele a ± 20 % din valorile medii măsurate.

▼M8

Apendicele 4

REGIM DE HRĂNIRE

Ar trebui remarcat faptul că, deși se recomandă acest regim de hrănire, sunt permise alternative, cu condiția ca organismele de testare să crească și să se dezvolte într-un ritm corespunzător.

Hrănirea larvelor

Pregătirea alimentației larvelor

A. 1:1 (v/v) Trout Starter: alge/TetraFin® (sau un produs echivalent);

1. Trout Starter: se amestecă 50 g de Trout Starter (granule mici sau praf) și 300 ml de apă filtrată adecvată într-un blender la viteză mare timp de 20 de secunde

2. un amestec alge/TetraFin® (sau un produs echivalent); se amestecă 12 g de dischete de alge spirulină și 500 ml de apă filtrată într-un blender la viteză mare timp de 40 de secunde, se amestecă 12 g de TetraFin® (sau un produs echivalent) cu 500 ml de apă filtrată, iar apoi acestea se combină pentru a constitui 1 l de 12 g/l alge spirulină și 12 g/l TetraFin® (sau un produs echivalent).

3. Se combină volume egale din amestecul Trout Starter și din amestecul alge/TetraFin® (sau un produs echivalent)

B. Creveți în saramură:

15 ml de ouă de creveți în saramură sunt sparte într-un litru de apă sărată (preparată prin adăugarea a 20 ml NaCl la 1 l de apă deionizată). Crevețiii în saramură sunt recoltați după aerarea timp de 24 de ore la temperatura ambiantă sub lumină constantă. Pe scurt, se permite așezarea creveților în saramură timp de 30 de minute prin oprirea aerării. Chisturile care plutesc în partea superioară a recipientului cilindric sunt deversate și eliminate, iar crevețiii sunt trecuți prin filtre corespunzătoare și aduși la 30 ml cu apă filtrată.

Protocolul de hrănire

Tabelul 1 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiile larvare ale expunerii. Exemplarele ar trebui să fie hrănite de trei ori pe zi, de luni până vineri, și o dată pe zi în weekend.

Tabelul 1

Regimul de hrănire pentru larvele *X. laevis* în condiții dinamice

Timp (*) (După fertilizare)	Trout Starter: alge/TetraFin® sau un produs echivalent)		Creveți în saramură	
	În timpul săptămânii (de trei ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)	În timpul săptămânii (de două ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)
Zilele 4-14 (în săptămânile 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (în zilele 8-15) 1 ml (din ziua 16)	0,5 ml (în zilele 8-15) 1 ml (din ziua 16)
Săptămâna 2	0,67 ml	2,4 ml		
Săptămâna 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Timp (*) (După fertilizare)	Trout Starter: alge/TetraFin® sau un produs echivalent)		Creveți în saramură	
	În timpul săptămânii (de trei ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)	În timpul săptămânii (de două ori pe zi)	În weekend (o dată pe zi)
Săptămâna 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămâna 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Săptămânile 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Ziua 0 este definită ca fiind ziua în care este realizată injecția hCG.

Tranziția de la regimul alimentar larvar la cel pentru puieți

Atunci când larvele încheie metamorfoza, acestea trec la o formulă de regim alimentar pentru puieți, care este explicată în continuare. În timpul acestei tranziții, regimul alimentar al larvelor ar trebui redus pe măsură ce crește cantitatea de hrană pentru puieți. Acest lucru se poate realiza prin scăderea proporțională a hranei larvare și, în același timp, creșterea proporțional a hranei pentru puieți, pe măsură ce fiecare grup de cinci mormoloci depășesc stadiul 62 din NF și se apropie de încheierea metamorfozei în stadiul 66 din NF.

Hrana puietului de pește

Regimul alimentar pentru puieți

După încheierea metamorfozei (stadiul 66), regimul alimentar se schimbă doar în cazul alimentației pentru broasca de mare de calitate superioară de 3/32 inch (Xenopus Express™, FL, SUA) sau o cantitate echivalentă.

Prepararea granulelor zdrobite pentru tranziția de la stadiul larvar la cel de puiet

Granulele alimentare pentru broasca de mare sunt măcinate pentru un timp scurt într-un aparat de măcinat cafea, un blender sau un mojar și pistil pentru a reduce dimensiunea granulelor cu aproximativ 1/3. Prin procesarea excesivă se produce praf, ceea ce nu este încurajat.

Protocolul de hrănire

Tabelul 2 cuprinde o referință cu privire la tipul și cantitatea de hrană utilizată în stadiul de puiet și de adult. Animalele ar trebui hrănite o dată pe zi. Ar trebui menționat că, în timpul metamorfozei exemplarelor, acestea continuă să primească o porțiune din creveții în saramură până când >95 % din exemplare încheie metamorfoza.

Exemplarele nu ar trebui să fie hrănite în ziua încheierii testului, pentru ca hrana să nu distorsioneze măsurătorile greutății.

Tabelul 2

Regimul de hrănire pentru puieții *X. laevis* în condiții dinamice. Ar trebui remarcat faptul că exemplarele nemetamorfozate, inclusiv cele a căror metamorfoză a fost întârziată de tratamentul chimic, nu pot mânca granule nezdrobite.

Timpul (*) (Săptămâni după data metamorfozei mediane)	Granule zdrobite (mg pe pui de broască)	Granule integrale (mg pe pui de broască)
Când exemplarele încheie metamorfoza	25	0
Săptămânile 0-1	25	28

▼**M8**

Timpul (*) (Săptămâni după data metamorfozei mediane)	Granule zdrobite (mg pe pui de broască)	Granule integrale (mg pe pui de broască)
Săptămânile 2-3	0	110
Săptămânile 4-5	0	165
Săptămânile 6-9	0	220

(*) Prima zi din săptămâna 0 este data metamorfozei mediane la exemplarele din martor.

▼M8

Apendicele 5

Determinarea Sexului Genetic (Sexare Genetică)P

Metoda de stabilire a sexului genetic pentru *Xenopus laevis* se bazează pe studiul lui Yoshimoto *et al.*, 2008. Dacă este necesar, pot fi obținute proceduri în detaliu din această publicație. Dacă se consideră adecvat, pot fi utilizate metode alternative (de exemplu, qPCR de mare capacitate).

Primaze X. laevis

Marker DM-W

Direct:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Invers:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Martor pozitiv

Direct:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Invers:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificarea ADN

Purificarea ADN din țesut muscular sau cutanat, utilizând, de exemplu, kitul Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat. nr. 69 506) sau un produs similar în conformitate cu instrucțiunile kitului. ADN-ul poate fi eluat din coloanele de centrifugare utilizând mai puțină soluție-tampon pentru a genera eșantioane mai concentrate dacă acest lucru se consideră necesar pentru PCR. Este de precizat că ADN-ul este destul de stabilă, așadar ar trebui să se acorde atenție evitării contaminării încrucișate care ar putea conduce la o caracterizare greșită a masculilor ca femele, sau invers.

PCR

Un model de protocol care utilizează JumpStart™ *Taq* de la Sigma este prezentat în **tabelul 1**.

Tabelul 1

Model de protocol care utilizează JumpStart™ *Taq* de la Sigma

Amestec principal	1x (µl)	[Final]
NFW (*)	11	—
10 X soluție tampon	2,0	—
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mm
dNTP (10 mm fiecare)	0,4	200 µM
Marker pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marker invers pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Martor pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
Martor invers pentru primază (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unități/µl
Model ADN	1,0	~200 pg/µl

(*) Apă fără nuclează (*Nuclease-free water* – NFW)
Notă: La pregătirea amestecurilor principale, se pregătesc cantități suplimentare pentru a completa orice pierderi care ar putea apărea în timp introducerii cu pipeta (de exemplu: 25x ar trebui să se folosească doar pentru 24 de reacții).

▼**M8**

Reacție:

Amestec principal	19,0 µl
Model	1,0 µl
Total	20,0 µl

Profil Thermocycler:

Etapa 1.	94 °C	1 min
Etapa 2.	94 °C	30 sec
Etapa 3.	60 °C	30 sec
Etapa 4.	72 °C	1 min
Etapa 5.	Treceți la etapa 2.	35 de cicluri
Etapa 6.	72 °C	1 min
Etapa 7.	4 °C	menținere

Produsele PCR pot fi testate imediat într-un gel sau păstrate la 4 °C.

Electroforeză în gel de agaroză (3 %) (model de protocol)

50X TAE

Tris	24,2 g
Acid acetic glacial	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Se adaugă apă la 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agaroză

3 părți de agaroză NuSieve™ GTG™

1 partea de agaroză Fisher electroendosmoză scăzută (EEO)

Metoda

1. Se prepară un gel de 3 % prin adăugarea a 1,2 g de amestec cu agaroză la 43 ml 1X TAE. Se agită pentru a desface bucățile mari.

2. Amestecul cu agaroză se încălzește în cuptorul cu microunde până la dizolvarea completă (a se evita fierberea). Se lasă să se răcească lent.

3. Se adaugă 1,0 µL de bromură de etidiu (10 mg/ml). Se rotește balonul. Trebuie remarcat faptul că bromura de etidiu este mutagenă, așadar ar trebui să se utilizeze pentru această etapă substanțele chimice alternative, în măsura în care acest lucru este posibil din punct de vedere tehnic, pentru a reduce riscurile pentru sănătatea lucrătorilor ([1]).

4. Se toarnă gel în formă cu pieptenele. Se răcește complet.

([1]) În conformitate cu articolul 4.1 din Directiva 2004/37/CE a Parlamentului European și a Consiliului din 29 aprilie 2004 privind protecția lucrătorilor împotriva riscurilor legate de expunerea la agenți cancerigeni sau mutageni la locul de muncă [a șasea directivă specială în sensul articolului 16 alineatul (1) din Directiva 89/391/CEE a Consiliului] (JO L 158, 30.4.2004, p. 50).

▼**M8**

5. Se adaugă gel în aparat. Se acoperă gelul cu 1X TAE.

6. Se adaugă 1 µl de 6x colorant de încărcare la fiecare 10 µl de produs PCR.

7. Se introduc eșantioane în godeuri cu pipeta.

8. Se analizează la 160 de volți constant timp de ~ 20 de minute.

În **figura 1** este prezentată o imagine de gel de agaroză care indică modele de exemplare de sex masculin și feminin.

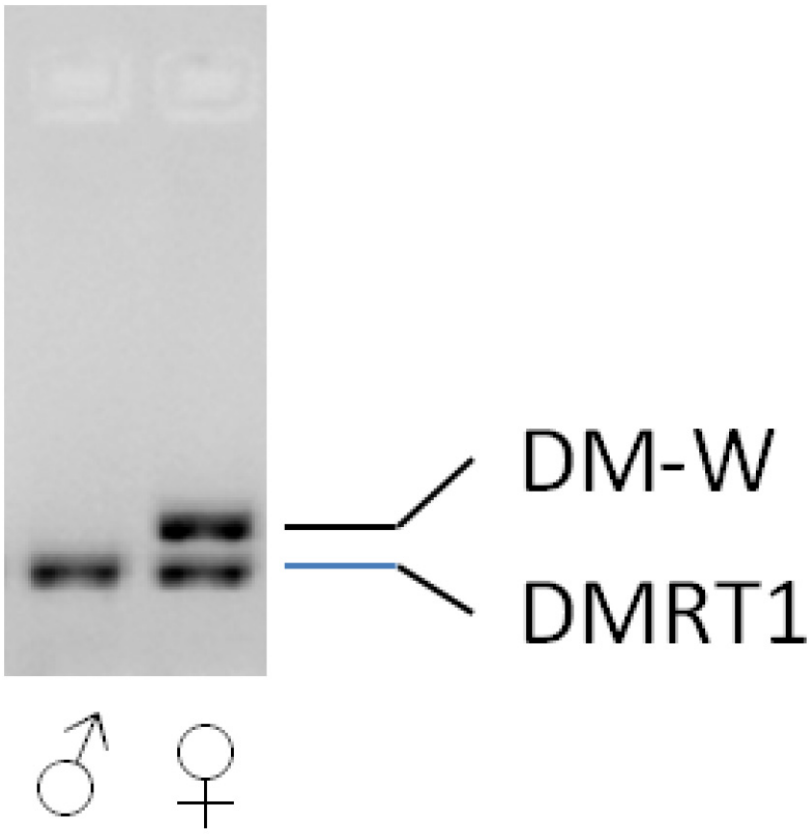


Figura 1 Imagine cu gel de agaroză care indică modelul orientativ de bandă pentru un exemplar mascul (♂), (bandă unică ~ 203 pb: DMRT1) și un exemplar femelă (♀) (două benzi la ~ 259 bp: DM-W și 203 bp:DMRT1).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

▼M8

Apendicele 6

Măsurarea Vitelogeninei

Măsurarea vitelogeninei (VTG) se face utilizând o metodă de analiză de imunoadsorbție cu anticorpi marcați enzimatic (ELISA), care a fost dezvoltată inițial pentru VTG a speciei fathead minnow (Parks *et al.*, 1999). În prezent, nu există anticorpi disponibili în comerț pentru *X. laevis*. Cu toate acestea, având în vedere abundența de informații pentru această proteină și disponibilitatea unor servicii de producție de anticorpi în comerț eficiente din punctul de vedere al costurilor, este rezonabil ca laboratoarele să poată desfășura cu ușurință un test ELISA pentru a efectua această măsurătoare (Olmstead *et al.*, 2009). De asemenea, Olmstead *et al.* (2009) oferă o descriere a analizei, astfel cum a fost modificată pentru VTG la *X. tropicalis*, prezentată în continuare. Metoda utilizează un anticorp realizat împotriva VTG a speciei *X. tropicalis*, dar este cunoscută, de asemenea, ca fiind aplicabilă pentru VTG a speciei *X. laevis*. Ar trebui remarcat faptul că pot fi utilizate, de asemenea, testele ELISA necompetitive și că este posibil ca acestea să aibă limite de detecție mai mici decât metoda descrisă mai jos.

Materiale și reactivi

— Ser cu primul anticorp (Ab) pre-adsorbit

— Se amestecă o parte de ser Anti-*X. tropicalis* VTG cu primul Ab cu două părți de plasmă de mascul cu martor și se lasă la temperatura camerei timp de ~ 75 de minute, se așează soluția pe gheață timp de 30 de minute, se centrifughează > 20K x G timp de 1 oră la 4 °C, se elimină supernatantul, partea alicotă și se păstrează la -20 °C.

— Al doilea anticorp

— Conjugat Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (de exemplu, Bio-Rad 172-1019)

— Standard VTG

— VTG de *X. laevis* purificat la 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' tetrametil-benzidină) (de exemplu, KPL 50-76-00; sau Sigma T0440)

— Ser normal de gâscă (NGS)(de exemplu, Chemicon® S26-100 ml)

— Plăci de microtitrare din polistiren EIA de 96 de godeuri (de exemplu, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Cuptor de hibridizare la temperatură de 37 °C (sau un incubator de aer cu echilibrare rapidă) pentru plăci, baie de apă pentru eprubete

— Alte echipamente de laborator, substanțe chimice și consumabile.

Rețete

Soluție-tampon de acoperire (50 mM de soluție-tampon carbonat, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
apă	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
apă	810 ml

▼M8

Soluție-tampon de spălare (PBST):

10X PBS	100 ml
apă	900 ml

Se ajustează pH-ul la 7,3 cu 1 M HCl, apoi se adaugă 0,5 ml Tween-20

Soluție-tampon de analiză:

Ser normal de gâscă (NGS)	3,75 ml
Soluție-tampon de spălare	146,25 ml

Eșantionare

Sângele se recoltează cu o eprubetă microhematocrită heparinizată și se așează pe gheață. După centrifugare timp de 3 de minute, eprubeta este punctată, se deschide, iar plasma este expulzată în eprubete de microcentrifugare de 0,6 ml care conțin 0,13 unități de aprotinină liofilizată. (Aceste eprubete sunt preparate în prealabil prin adăugarea cantității adecvate de aprotinină, congelare și liofilizare într-un concentrator de tip speed-vac la căldură redusă până la uscare.) Plasma se păstrează la -80 °C până la analiză.

Procedura pentru o singură placă

Acoperirea plăcii

Se amestecă 20 µl de VTG purificată cu 22 ml de soluție-tampon de carbonat (final 3 µg/ml). Se adaugă 200 µl în fiecare godeu de pe o placă cu 96 de godeuri. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Blocarea plăcii

Soluția de blocare este preparată prin adăugarea a 2 ml de Normal Goat Serum (NGS) la 38 ml de soluție-tampon de carbonat. Se îndepărtează soluția de acoperire și se agită conținutul uscat. Se adaugă 350 µl de soluție de blocare în fiecare godeu. Se acoperă cu o peliculă de adeziv de etanșare și se incubează peste noapte la 37 °C pentru 2 ore (sau la 4 °C peste noapte).

Prepararea standardelor

5,8 µl de VTG standard purificat se amestecă cu 1,5 ml de soluție-tampon de analiză într-o eprubetă de testare din sticlă de borosilicat de unică folosință de 12 × 75 mm. Se obține astfel o cantitate de 12 760 ng/ml. Apoi se efectuează o diluție în serie prin adăugarea de 750 µl din diluția anterioară la 750 µl de soluție-tampon de analiză pentru a genera concentrații finale de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 și 50 ng/ml.

Prepararea eșantioanelor

Se începe cu o diluție de 1:300 (de exemplu, se combină 1 µl de plasmă cu 299 µl de soluție-tampon de analiză) sau de 1:30 de plasmă în soluție-tampon de analiză. În cazul în care se preconizează o cantitate mare de VTG, pot fi necesare diluții suplimentare sau mai mari. Încercați să mențineți B/B_o în intervalul standardelor. În cazul eșantioanelor care nu au o valoare VTG apreciabilă, de exemplu, martorii masculi și femele (care sunt toți imaturi), se utilizează diluția de 1:30. Eșantioanele, diluate mai puțin de această valoare, pot prezenta efecte de matrice nedorite.

În plus, se recomandă să se analizeze un eșantion de martor pozitiv pe fiecare placă. Acesta provine dintr-o rezervă de plasmă care conține niveluri de VTG puternic induse. Rezerva este diluată inițial în NGS, împărțită în părți alicote și păstrată la -80 C. Pentru fiecare placă o parte alicotă se congelează, se diluează apoi în soluție-tampon de analiză și se testează similar unui eșantion de testare.

▼M8

Incubația cu primul anticorp

Primul anticorp este pregătit prin efectuarea unei diluții de 1:2000 a serului cu primul anticorp pre-adsorbit în soluția-tampon de analiză (de exemplu, soluție-tampon de analiză 8 µl-16 ml). Se combină 300 µl din soluția cu primul anticorp cu 300 µl de eșantion/soluție standard într-o eprubetă de sticlă. Eprubeta B_o se prepară în mod similar cu 300 µl de soluție-tampon de analiză și 300 µl de anticorp. De asemenea, ar trebui să se prepare o eprubetă NSB utilizând numai 600 µl de soluție-tampon de analiză, și anume, niciun fără anticorp. Se acoperă eprubetele cu Parafilm și se agită ușor pentru amestecare. Se incubează într-o baie de apă la 37 °C timp de 1 oră.

Spălarea plăcii

Chiar înainte de finalizarea incubării primului anticorp, se spală placa. Aceasta se realizează prin scuturare pentru eliminarea conținutului și tamponarea pe hârtie absorbantă pentru uscare. Godeurile sunt apoi umplute cu 350 µl de soluție de spălare, șterse și uscate. Aici este utilă o pipetă cu mai multe canale cu picurare repetată sau un sistem de spălare a plăcii. Etapa de spălare se repetă de încă două ori, executându-se în total trei spălări.

Încărcarea plăcii

După spălarea plăcii, se îndepărtează eprubetele din baia de apă și se agită ușor. Se adaugă 200 µl din fiecare eșantion, din soluția standard, B_o și eprubeta NSB pentru a duplica godeurile plăcii. Se acoperă placa cu o peliculă de adeziv de etanșare și se lasă la incubat timp de o oră la 37 °C.

Incubația cu al doilea anticorp

La sfârșitul incubării din etapa anterioară, placa ar trebui să fie spălată din nou de trei ori, la fel ca mai sus. Se prepară al doilea anticorp diluat prin amestecarea a 2,5 µl din al doilea anticorp cu 50 ml de soluție-tampon de analiză. Se adaugă 200 µl din al doilea anticorp diluat în fiecare godeu, se etanșează ca mai sus și se incubează timp de 1 oră la 37 °C.

Adăugarea de substrat

După ce incubația cu al doilea anticorp s-a încheiat, se spală placa de trei ori, astfel cum s-a descris anterior. Apoi se adaugă 100 µl de substrat TMB în fiecare godeu. Se lasă reacția timp de 10 minute pentru a se desfășura, de preferință, ferită de lumina puternică. Se oprește reacția prin adăugarea a 100 µl de acid fosforic 1 M. Aceasta va determina schimbarea culorii din albastru în galben intens. Se măsoară absorbanța la 450 nm utilizând un cititor de placă.

Calcularea B/Bo

Se scade valoarea medie a NSB din toate măsurătorile. Se calculează B/B_o pentru fiecare eșantion și soluție standard împărțind valoarea absorbanței (B) la absorbanța medie a eșantionului B_o.

Se obține curba standard și se determină valorile necunoscute

Se generează o curbă standard cu ajutorul unui software de grafică pe calculator (de exemplu, Slidewrite™ sau Sigma Plot®) care va extrapola cantitatea din B/B_o a eșantionului pe baza B/B_o a standardelor. De regulă, cantitatea este reprezentată grafic pe o scară logaritmică și curba are o formă sigmoidă. Însă, este posibil să apară liniară atunci când se utilizează o gamă restrânsă de standarde. Se corectează cantitățile eșantionului pentru factorul de diluție, acestea fiind consemnate ca mg VTG/ml din plasmă.

Determinarea limitelor de detecție minime (MDL)

Adesea, în special la masculii normali, nu este clar cum să se raporteze rezultatele obținute pe baza valorilor mici. În aceste cazuri, ar trebui să se utilizeze „limitele de încredere” de 95 %, pentru a stabili dacă valoarea respectivă ar trebui

▼M8

consemnată ca fiind zero sau ca un alt număr. În cazul în care rezultatul eșantionului se încadrează în intervalul de încredere al standardului zero (B_o), rezultatul ar trebui consemnat ca fiind zero. Nivelul minim de detecție va fi cel mai scăzut standard care este în mod consecvent diferit de standardul zero; adică, cele două intervale de încredere nu se suprapun. Pentru orice rezultat al eșantionului care se încadrează în limita de încredere a nivelului minim de detecție, sau depășește această limită, se va consemna valoarea calculată. În cazul în care un eșantion se încadrează între standardul zero și intervalele de încredere ale nivelului minim de detecție, ar trebui să se consemneze o jumătate din nivelul minim de detecție pentru valoarea eșantionului respectiv.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

Apendicele 7

Analiza Statistică

LAGDA generează trei forme de date de analizat din punct de vedere statistic: (1) date continue cantitative, (2) date despre timpul până la evenimente pentru ratele de dezvoltare (timpul până la stadiul 62 din NF) și (3) date ordinale sub formă de punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare obținute în urma evaluărilor histopatologice. Arborele decizional pentru analiza statistică recomandat pentru LAGDA este prezentat în figura 1. De asemenea, mai jos sunt indicate unele adnotări care ar putea fi necesare pentru a efectua analiza statistică pentru măsurătorile LAGDA. Pentru arborele decizional de analiză, ar trebui să se analizeze rezultatele măsurătorilor pentru mortalitate, creștere (greutate și lungime) și indicele somatic pentru ficat (LSI) în conformitate cu secțiunea „Alte puncte finale”.

Flux continuu de date

Datele pentru punctele finale continue ar trebui să fie mai întâi verificate în ceea ce privește monotonicitatea prin transformarea datelor prin clasificare, corelarea cu un model ANOVA și compararea contrastelor liniare și pătratice. În cazul în care datele sunt monotone, se efectuează un test al tendințelor cu regresie Jonckheere-Terpstra pe valorile medii ale replicilor și nu ar trebui să se mai aplice analize ulterioare. O alternativă pentru datele care sunt distribuite în mod normal cu variații omogene este testul cu regresie Williams. Dacă datele nu sunt monotone (contrastul pătratic este semnificativ și cel liniar nu este semnificativ), acestea ar trebui să fie analizate folosind un model ANOVA de efecte mixte. Ulterior, datele ar trebui să fie evaluate pentru normalitate (de preferat, folosind testul Shapiro-Wilk sau Anderson-Darling) și omogenitatea varianței (de preferință, folosind testul Levene). Ambele teste sunt efectuate pe valorile reziduale din modelul ANOVA de efecte mixte. Se poate recurge la opinia experților în locul acestor teste formale privind normalitatea și omogenitatea varianței, deși sunt preferate testele formale. În cazul în care datele sunt distribuite în mod normal cu o varianță omogenă, ipotezele unui efect mixt ANOVA se confirmă și se determină un efect semnificativ al tratamentului din testul lui Dunnett. În cazul în care se constată non-normalitatea sau caracterul eterogen al varianței, atunci se încalcă ipotezele testului lui Dunnett și se caută o transformare pentru normalizare și stabilizare a varianței. În cazul în care nu se constată o astfel de transformare, atunci se determină un efect semnificativ al tratamentului, cu un test al lui Dunn. Ori de câte ori este posibil, ar trebui să se efectueze un test unidirecțional, față de un test bidirecțional, însă se impune o apreciere profesională pentru a decide care este corespunzător pentru un anumit punct final.

Mortalitate

Datele privind mortalitatea ar trebui să fie analizate pentru perioada de timp care cuprinde întregul test și ar trebui să fie exprimate ca proporție care a murit într-un anumit bazin. Mormolocii care nu încheie procesul de metamorfoză în intervalul de timp dat, acei mormoloci care se află în sub-eșantionul de cohortă larvară, acei pești tineri care sunt eliminați, precum și orice animal care moare din cauza unei erori a experimentatorului ar trebui să fie tratați ca date cenzurate și să nu fie incluși în numitorul calculului procentual. Înainte de orice analiză statistică, ar trebui ca proporția mortalității să fie transformată în arcsin-rădăcină pătrată. O alternativă este utilizarea testului Cochran-Armitage de regresie, eventual cu o ajustare Rao-Scott în prezența supradispersiei.

Greutatea și lungimea (date privind creșterea)

Masculii și femelele nu sunt dimorfe din punct de vedere sexual în timpul metamorfozei, astfel încât datele privind creșterea în sub-eșantionul larvar ar trebui să fie analizate independent de sex. Cu toate acestea, datele privind creșterea puietului ar trebui să fie analizate separat pe criterii de sex genetic. Pentru aceste puncte finale este posibil să fie nevoie de o transformare log, deoarece normalitatea log a datelor privind dimensiunile nu este un lucru neobișnuit.

▼M8

Indicele somatic pentru ficat (LSI)

Greutățile ficatului ar trebui să fie normalizate ca proporții din greutățile totale ale corpului (și anume, LSI) și ar trebui să fie analizate separat pe baza sexului genetic.

Timp până la stadiul 62 din NF

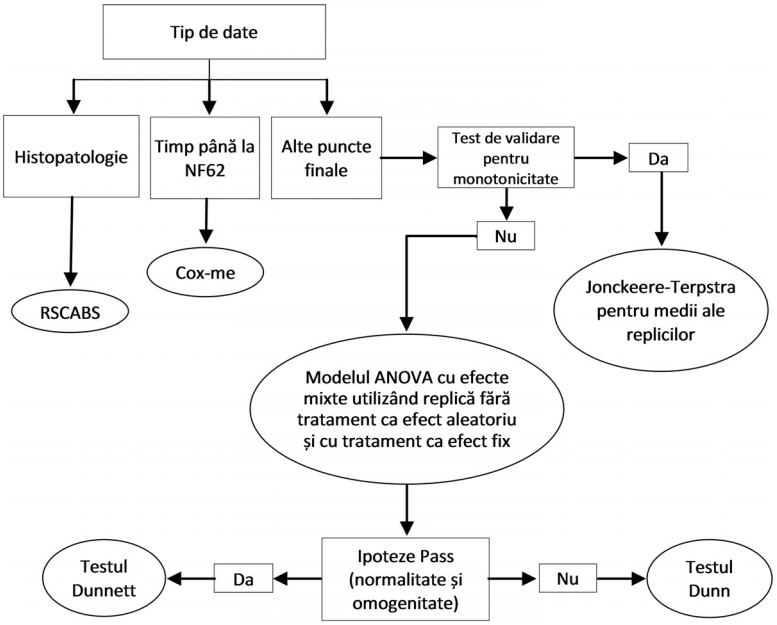
Datele privind timpul până la metamorfoză ar trebui să fie tratate ca date privind timpul până la eveniment, iar orice cazuri de mortalitate sau de exemplare care nu ajung în stadiul 62 NF în 70 de zile ar trebui tratate drept date cenzurate de drept (și anume, valoarea reală este mai mare de 70 de zile, dar studiul se încheie înainte ca animalele să fi atins stadiul 62 NF în 70 de zile). Timpul median până la încheierea stadiului 62 NF al metamorfozei la martorii din apa de diluție ar trebui să fie utilizat pentru stabilirea datei de încheiere a testului. Timpul mediu pentru încheierea metamorfozei ar putea fi determinat de factorii de estimare produs-limită Kaplan-Meier. Acest punct final ar trebui să fie analizat utilizând un model de risc proporțional cu efecte mixte Cox, care ține seama de structura replicată a studiului.

Date privind histopatologia (punctaje de severitate și stadii de dezvoltare)

Datele privind histopatologia sunt prezentate sub forma unor punctaje de severitate sau stadii de dezvoltare. Un test denumit RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) utilizează un test al tendințelor Cochran-Armitage cu Rao-Scott cu regresie ajustat la fiecare nivel de severitate în cadrul unui răspuns histopatologic (Green *et al.*, 2014). Ajustarea Rao-Scott integrează în test modelul experimental al recipientului replicat. Procedura „by Slices” integrează estimarea biologică conform căreia severitatea efectelor tinde să crească, odată cu creșterea dozelor sau a concentrațiilor, păstrând în același timp punctajele individuale și indicând severitatea oricărui efect identificat. Procedura RSCABS nu doar determină tratamentele care sunt diferite din punct de vedere statistic de martori (și anume, au o patologie mai severă decât martorii), ci determină, de asemenea, la ce punctaj de severitate apare diferența, oferind astfel un context atât de necesar pentru analiză. În cazul stabilirii stadiilor de dezvoltare la gonade și canalele de reproducere, ar trebui să se aplice o manipulare suplimentară a datelor, întrucât una dintre ipotezele RSCABS este aceea că gradul de severitate crește odată cu doza. Efectul observat ar putea fi o întârziere sau o accelerare a dezvoltării. Prin urmare, datele privind stadiile de dezvoltare ar trebui să fie analizate, astfel cum au fost consemnate, pentru a detecta accelerarea procesului de dezvoltare și apoi a trece manual la o a doua analiză pentru a detecta o întârziere în dezvoltare.

Figura 1

Arborele decizional al analizei statistice pentru datele LAGDA.



▼M8

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

▼M8

Apendicele 8

CONSIDERENTE PRIVIND URMĂRIREA ȘI MINIMIZAREA APARIȚIEI SCOLIOZEI

Scolioza idiopatică, ce se manifestă, de obicei, prin coadă îndoită la mormoloci *Xenopus laevis*, ar putea complica observațiile morfologice și comportamentale la populațiile testate. Ar trebui să se depună eforturi pentru a reduce la minimum sau a elimina incidența scoliozei, atât în stoc, cât și în condiții de testare. În cadrul testului final, se recomandă ca prevalența scoliozei moderate și severe să fie sub 10 %, pentru o mai bună încredere că testul poate detecta efecte la nivelul dezvoltării care sunt corelate cu tratamentul la larvelor amfibieni care sunt sănătoase în alte condiții.

Observațiile zilnice din timpul testului final ar trebui să înregistreze atât incidența (numărul individual), cât și severitatea scoliozei, în cazul în care acestea există. Natura anomaliei ar trebui să fie descrisă cu referire la locație (de exemplu, anterior sau posterior față de cloacă) și direcția curburii (de exemplu, lateral sau dorsto-ventrală). Severitatea poate fi clasificată după cum urmează:

(NR) Nu este remarcabilă: nu există o curbură

(1) Minimă: ușoară, curbură laterală posterior față de cloacă; aparent doar în repaus

(2) Moderată: curbură laterală posterior față de cloacă; vizibilă în orice moment, dar nu împiedică deplasarea

(3) Severă: curbură laterală anterior față de cloacă; SAU orice curbură care inhibă deplasarea; SAU orice curbură dorsoventrală

Un comitet științific consultativ FIFRA al US EPA (FIFRA SAP 2013) a analizat datele sintetizate pentru scolioză în cadrul a cincisprezece analize privind metamorfoza la amfibii pe *X. laevis* (de la stadiul NF 51 până la 60+) și a prezentat recomandări generale pentru reducerea prevalenței acestei anomalii la populațiile de testare. Recomandările sunt relevante pentru LAGDA, chiar dacă acest test cuprinde un calendar de dezvoltare mai lung.

Performanța istorică privind depunerea icrelor

În general, ca perechi de reproducție ar trebui să fie utilizați adulții sănătoși și de înaltă calitate; eliminarea perechilor de reproducție care produc pui cu scolioză poate reduce la minim apariția acesteia în timp. În mod specific, ar putea fi benefică reducerea la minimum a utilizării stocului de reproducere cu exemplare capturate în sălbăticie. Perioada de expunere LAGDA începe cu stadiul NF cu 8-10 embrioni și nu este posibil să se determine încă de la începutul testului dacă anumite exemplare vor prezenta scolioză. Astfel, în afară de urmărirea incidenței scoliozei la animalele supuse testului, ar trebui să se documenteze performanța istorică privind seria de icre (inclusiv prevalența scoliozei la orice larve permise să se dezvolte). Ar putea fi util să se monitorizeze în continuare porțiunea fiecărei serii de icre care nu sunt utilizate într-un anumit studiu și să se consemneze aceste observații (FIFRA SAP 2013).

Calitatea apei

Este important să se asigure o calitate adecvată a apei, atât în stocul din laborator, cât și în timpul testului. În plus față de criteriile privind calitatea apei, care sunt evaluate în mod curent pentru testele de toxicitate acvatică, poate fi util să se monitorizeze și să se corecteze orice deficiențe de nutrienți (de exemplu, deficiența de vitamina C, calciu, fosfor) sau nivelurile în exces de seleniu și de cupru, care sunt raportate a provoca scolioză în grade diferite la speciile crescute în laborator *Rana* sp. și *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; astfel cum au fost raportate în FIFRA 2013). Utilizarea unui regim alimentar adecvat (a se vedea apendicele 4) și curățarea periodică a bazinelor, vor îmbunătăți, în general, calitatea apei și sănătatea exemplarelor de testare.

▼M8

Regimul alimentar

Recomandări specifice privind un regim alimentar, care se constată că au fost reușite în cazul LAGDA, sunt prezentate în detaliu în apendicele 4. Se recomandă ca sursele de hrană pentru animale să fie verificate pentru a detecta prezența toxinelor biologice, a erbicidelor și a altor pesticide despre care se știe că provoacă scolioză la *X. laevis* sau la alte animale acvatice (Schlenk și Jenkins 2013). Spre exemplu, expunerea la anumiți inhibitori ai colinesterazei a fost asociată cu scolioza la pești (Schultz *et al.* 1985) și broaște (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara și G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110-118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont și R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley și J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski și D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez și P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D. și Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21-23 mai 2013. Washington, DC.”